



Andreia Sofia Valentim de Carvalho

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Preparação e caracterização de filmes poliméricos inteligentes incorporando grafenos para aplicações biomédicas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Carla Alexandra Moreira Portugal,
DQ-FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor João Paulo Crespo;
DQ-FCT/UNL

Arguente: Professor Doutor Vítor Alves
Vogal: Doutora Carla Portugal
Presidente: Professor Doutor Mário Eusébio



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2014

Andreia Sofia Valentim de Carvalho

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Preparação e caracterização de filmes poliméricos
inteligentes incorporando grafenos para aplicações
biomédicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Carla Alexandra Moreira Portugal, DQ-FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor João Paulo Crespo, DQ-FCT/UNL

Desenvolvimento e caracterização de filmes inteligentes incorporando grafenos para aplicações biomédicas

“Copyright”

Eu, Andreia Sofia Valentim de Carvalho, declaro que a Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, um especial apreço pela solicitude, motivação, apoio e acompanhamento dado neste trabalho, pela minha orientadora Professora Doutora Carla Portugal. Agradeço-lhe toda a disponibilidade dispensada na ajuda que me deu ao longo destes últimos meses deste meu percurso académico, a qual resultou numa enorme apreensão de novos conhecimentos, os quais se converteram em novas competências práticas no domínio da engenharia química.

Agradeço ao Professor Doutor João Paulo Crespo, pela motivação que me incutiu na entrevista inicial, a qual me ajudou na tomada de decisão em abraçar este tema, com tanto ainda por explorar.

À Doutora Luísa Neves e Doutoranda Carla Daniel, pela simpatia, pela disponibilidade incondicional e companheirismo que evidenciaram nos momentos em que lhes solicitei ajuda para alguns procedimentos.

À minha companheira de trabalho, Ana Carina Manjua, um muito obrigado pelo companheirismo, orientação, ajuda disponibilizada, paciência e acima de tudo, pela amizade que viemos a criar desde o início desta aventura.

A todas as pessoas do grupo BPEG por me terem acolhido e permitirem sempre um bom ambiente de trabalho. Agradeço à Marisa Marques e à Flávia pelos momentos de humor e boa disposição.

À Raquel Trindade, à Marta Barbosa, à Catarina Cavaco, à Lara Luís, à Sara Madeira, à Sara Barbosa, ao João Garcia e ao Ricardo Morgado, um obrigado muito especial pela vossa amizade ao longo destes anos, pelos momentos de diversão, por estarem sempre presentes, nos bons e maus momentos. Obrigada.

A todos as pessoas que tive o enorme prazer de conhecer durante este meu percurso académico, particularmente à Ana Coelhas, à Ana Azevedo, à Ana Silva, ao Diogo Cardoso, à Sofia Silva e ao Nelson Lima. Ao Hugo Andrade pelo apoio incondicional, amizade, compreensão, afecto, dedicação, e por todas as alegrias e momentos especiais partilhados ao longo deste ano. À Alexandra Loupas, pelo companheirismo, compreensão, paciência e sobretudo pela amizade verdadeira.

Por último à minha família, principalmente aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio incondicional, pela compreensão e carinho demonstrado desde sempre. O meu sincero obrigado.

Dedico este trabalho à memória do meu avô António e do meu primo Pedro. Sei que olham por mim lá de cima. Com imensas saudades, um obrigado.

*“Em todos os debates intelectuais, ambos os lados
tendem a estar certos naquilo que afirmam e errados
naquilo que negam.”*

John Stuart Mill

O objectivo deste trabalho foi combinar o comportamento magnético de micropartículas de óxido de grafeno (GO) modificado com Fe_3O_4 (GO - 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com as propriedades do polímero álcool polivinílico (PVA), nomeadamente a sua elasticidade, de forma a obter-se materiais poliméricos com capacidade de reversão das suas características estruturais, topográficas e consequentemente controlar as suas características de transporte por ajuste de campo magnético.

Preparou-se e caracterizou-se filmes/membranas poliméricas de PVA com GO na presença e ausência de campo magnético. Caracterizou-se a morfologia destas membranas, através de microscopia óptica e de varrimento electrónico; o efeito na superfície de membranas por incorporação de GO através de ângulos de contacto, a avaliação da estabilidade estrutural e química através de estudos de inchamento e degradação, adsorção de proteínas e o impacto da presença de GO e o seu comportamento magnético na permeabilidade a gases.

As membranas apresentaram boa afinidade com o GO, e um bom alinhamento das micropartículas quando expostas a campo. A estabilidade estrutural foi avaliada durante um período de imersão de 28 dias, usando uma solução de PBS a 0.01M, a pH 6.9 e a 37°C. A análise dos espectros de UV-Vis obtidos para solução de imersão ao longo do tempo não revelaram degradação das membranas. O efeito na rugosidade da superfície das membranas por incorporação de GOs obteve-se através de ensaios de ângulos de contacto de glicerol. Verificou-se um aumento destes com o aumento de %GO; uma diminuição dos ângulos quando as membranas humidificadas foram expostas a um campo magnético de intensidade 0.0832T; e um aumento destes nas membranas expostas a humidade e temperatura controlada, a 50% e 17°C. Foi observado o efeito do conteúdo magnético existente nas membranas alinhadas e não-alinhadas, com diferentes %GO, no desempenho da adsorção de BSA, submetidas a campo. Verificou-se um aumento de adsorção na membrana com menor %GO, devido provavelmente ao aumento da sua rugosidade; e a diminuição de adsorção com o aumento de intensidade de campo. Nos ensaios de permeabilidade, observou-se que a membrana de PVA (0% GO) é mais permeável ao CO_2 do que ao O_2 . As membranas com GOs (0.05% e 0.1%) apresentam uma maior permeabilidade ao O_2 do que ao CO_2 , devendo-se isto a uma provável alteração topográfica das membranas por incorporação das micropartículas já referidas.

Palavras-chave: Hidrogéis magneto-sensíveis, álcool polivinílico, óxido de grafeno, campos magnéticos, permeação gasosa.

Abstract

The purpose of this study was to combine the modified Fe_3O_4 magnetic behavior of microparticles of graphene oxide (GO), with the properties of the polymer polyvinyl alcohol (PVA), particularly, their elasticity in order to obtain polymeric materials capable of reversion their structures, topographical characteristics, and thus control their transport characteristics by adjusting the magnetic field.

The characterization of the membranes with PVA GO morphology were made by the optical microscopy and scanning electron; The effect of incorporation of GO through the surface contact angle; The evaluation of structural and chemical stability by studying the swelling and degradation; the protein adsorption and the impact of the presence of OG and final their magnetic behavior in permeability.

The membranes exhibited good affinity with the GO. Structural stability was assessed over a period of 28 days immersion, using a solution of 0.01M PBS, pH 6.9 and at 37°C. The analysis of the UV-Vis spectra obtained for dipping solution over time revealed the release of unbound materials. The roughness effect on surface of the membranes by the addition of GO, was obtain by the contact angles test with glycerol. There was an increase of the contact angles with the increase of %GO; a reduction of the contact angles when wetted membranes were expose to an external magnetic field and an increase in the membranes followed by the exposure of a specific magnetic field intensity (0.0832T). That was observing the effect of GO's incorporation in the aligned and non-aligned membranes with different micro particles in the performance of BSA adsorption. There was an adsorption increase in the membranes with smaller GO%, probably because of the increased of surface roughness and in the other and a decrease of the adsorption with an increase of the field's intensity. It was renowned that the membrane of PVA (0% GO) is more permeable to CO_2 than the O_2 . The membranes with GO microparticles (0.05% and 0.1%) have a higher permeability to CO_2 rather than O_2 .

Keywords: Magneto-sensitive hydrogels, polyvinyl alcohol, graphene oxide, magnetic field, gas permeation.

Índice geral

Agradecimentos.....	v
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xix
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xxi
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica	5
2.1. Hidrogéis e suas aplicações.....	5
2.1.1. Hidrogéis	5
2.1.1.1. Preparação de hidrogéis	5
2.1.1.2. Classificação de hidrogéis.....	6
2.1.1.3. Propriedades físico-químicas dos hidrogéis	6
2.2. Álcool polivinílico (PVA)	7
2.3. Engenharia de tecidos.....	9
3. Materiais e métodos	11
3.1. Reagentes utilizados	11
3.2. Funcionalização de membranas de hidrogel com resposta magnética	11
3.2.1. Preparação de membranas magnéticas de PVA	11
3.3. Caracterização estrutural de membranas de hidrogel	15
3.3.1. Microscopia Óptica	15
3.3.2. Análise morfológica de membranas de hidrogel através de microscopia electrónica de varrimento (SEM)	16
3.4. Avaliação da estabilidade estrutural e química das membranas de hidrogel	16
3.4.1. Estudo de inchamento de hidrogéis	16
3.4.2. Estudo de degradação de hidrogéis.....	17
3.5. Análise do efeito da presença de óxido de grafeno nas propriedades da superfície das membranas, por determinação dos ângulos de contacto.....	18
3.6. Adsorção de proteínas em membranas magnéticas.....	19
3.7. Impacto da presença de óxido de grafenos (GOs) e do seu comportamento magnético no transporte de gases através das membranas de hidrogel funcionalizadas	21
4. Discussão de resultados	27
4.1. Funcionalização de membranas de hidrogel com resposta magnética	27
4.2. Caracterização estrutural de membranas de hidrogel	30
4.2.1. Análise morfológica de membranas de hidrogel através de microscopia óptica e electrónica de varrimento (SEM).....	30
4.3. Avaliação da estabilidade estrutural e química das membranas de hidrogel	33
4.3.1. Estudo de inchamento de hidrogéis	36
4.3.2. Estudos de degradação de hidrogéis.....	38

4.4.	Análise do efeito da presença de óxido de grafenos nas propriedades de superfície das membranas, por determinação dos ângulos de contacto.....	42
4.5.	Adsorção de proteínas em membranas magnéticas.....	46
4.6.	Impacto da presença de óxido de grafenos (GOs) e do seu comportamento magnético no transporte de gases através das membranas de hidrogel funcionalizadas	48
5.	Conclusão.....	55
6.	Trabalho futuro	59
7.	Referências bibliográficas	61
8.	Anexos.....	A

Índice de Figuras

Figura 1.1. Ligação química do GO ao PVA. Adaptado de [9].	3
Figura 2.1: Estrutura de hidrogéis químicos e físicos [14].	5
Figura 2.2: Inchamento de hidrogéis [14].	6
Figura 2.3: Pontes acetais resultantes da reacção de PVA com GDA. Adaptado de [29].	8
Figura 2.4: Mecanismo da reacção de acetaliação do PVA com glutaraldeído. Adaptado de [30].	8
Figura 2.5: Reacção do PVA com o GDA catalisada por um ácido. Adaptado de [29].	9
Figura 2.6: Engenharia de tecidos. Adaptado de [34].	10
Figura 3.1: Preparação de membranas poliméricas de PVA com micropartículas de GO.	13
Figura 3.2: Variação da intensidade de campo magnético em relação à distância (E - Extremidade mais próxima do magneto; C – centro da placa e E' – Extremidade mais afastada do magneto).	14
Figura 3.3: Variação de intensidade de campo magnético com a distância ao magneto. (E - Extremidade mais próxima do magneto; C – centro da placa; E' – Extremidade mais afastada do magneto; Pontos azuis-claros – placa redonda menor (d=5cm); Pontos verdes – placa redonda maior (d=10cm)).	15
Figura 3.4: Microscópio <i>Olympus</i> e máquina fotográfica Canon.	15
Figura 3.5: <i>Software</i> CAM 100 e Goniómetro.	18
Figura 3.6: Estrutura cristalina da BSA.[42]	19
Figura 3.7: Isomerização conformacional da BSA.[45]	20
Figura 3.8: Equipamento indutor de campo magnético. Magneto circular: intensidade de 0.0832T e Electromagnetos: intensidade de 1.198T.	20
Figura 3.9: Instalação e célula de permeação.	21
Figura 4.1: Imagens microscópicas das membranas com diferentes percentagens GO, preparadas na ausência e presença de campo magnético. Imagens obtidas por microscópio com ampliação 4x e zoom 362mm.	30
Figura 4.2: Imagens SEM do corte transversal da membrana de PVA (1) e da membrana preparada com 0.2% de GO alinhada (2). A seta azul indica a orientação de campo magnético aplicado.	31
Figura 4.3: Imagens SEM do corte transversal da membrana preparada com 0.2% de GO, na ausência de campo magnético (3), e sob influência de campo magnético (4).	32
Figura 4.4: Distribuição de tamanhos dos agregados de micropartículas de GO presentes na membrana representada na Figura 4.3 (1).	32
Figura 4.5: Imagens SEM do corte transversal (5 – x200) da membrana de álcool polivinílico, e da membrana preparada com 0,2% GO na ausência de campo, com diferentes ampliações (6- x800; 7-x1500 e 8-x10000).	33
Figura 4.6: Espectro de absorvâncias do volume de sobrenadante medido ao longo do tempo de imersão de uma membrana com 0.1% GO e 3% GDA, sem influência de campo magnético.	34
Figura 4.7: Espectro de absorvâncias do volume de sobrenadante medido ao longo do tempo de imersão de uma membrana com 0.1% GO e 6% GDA, sem influência de campo magnético.	34
Figura 4.8: Variação de massa da membrana 0.1% GO para membranas preparadas na ausência de campo magnético, com diferentes concentrações de GDA (3% - linha azul e 6% de GDA – linha verde).	35
Figura 4.9: Esquema representativo do efeito da concentração de agente reticulante na estrutura polimérica: (1) alta percentagem de agente reticulante e (2) baixa percentagem de agente reticulante.	35
Figura 4.10: Variação de massa das membranas em estudo, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com menor concentração de GDA (3%) ao longo do tempo de imersão, preparadas na ausência (não alinhado – linha a cheio) e na presença (alinhado –	

linhas a tracejado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).....	36
Figura 4.11: Variação da massa das membranas em estudo, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com maior concentração de GDA (6%) ao longo do tempo de imersão, preparadas na ausência (não alinhado – linha a cheio) e na presença (alinhado – linhas a tracejado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).....	37
Figura 4.12: Variação de volume das membranas em estudo, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com maior concentração de GDA (3%) ao longo do tempo de imersão, preparadas na ausência (não alinhado – linha a cheio) e na presença (alinhado – linhas a tracejado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).....	38
Figura 4.13: Variação de volume das membranas em estudo, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com maior concentração de GDA (6%) ao longo do tempo de imersão, preparadas na ausência (não alinhado – linha a cheio) e na presença (alinhado – linhas a tracejado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).....	38
Figura 4.14: Variação da massa das membranas de álcool polivinílico (PVA) com diferentes concentrações de óxido de grafeno (GO) e 3% de agente reticulante, GDA, preparadas na ausência (não alinhado) e na presença (alinhado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).	39
Figura 4.15: Zoom da Figura 4.12, assinalado a vermelho. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).	40
Figura 4.16: Variação da massa das membranas de álcool polivinílico (PVA) com diferentes concentrações de óxido de grafeno (GO) e 6% de agente reticulante, GDA, preparadas na ausência (não alinhado) e na presença (alinhado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).	40
Figura 4.17: Zoom da Figura 4.14, assinalado a vermelho. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).	40
Figura 4.18: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.05% GO, não orientada e 3% de agente reticulante (GDA).	41
Figura 4.19: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.05% GO, não orientada e 6% de agente reticulante (GDA).	42
Figura 4.20: Medição de ângulos de contacto da membrana de PVA com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) e concentração constante de GDA (3%), no máximo grau de inchamento na ausência de campo magnético externo.....	43
Figura 4.21: Ângulos de contacto do glicerol na superfície de membranas de PVA com 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% de GO e 3%GDA, no máximo grau de inchamento (azul) e presença de campo magnético externo de intensidade 0.0832T (verde), não-alinhadas (círculos a cheio) e alinhadas (círculos vazios).	44
Figura 4.22: Ângulos de contacto do glicerol na superfície de membranas de PVA com 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% de GO e 3%GDA no máximo grau de inchamento (azul) e equilibradas à temperatura e humidade de 50% e T=17°C (verde), não-alinhadas (círculos a cheio) e alinhadas (círculos vazios).	45
Figura 4.23: Recta de calibração para a determinação da concentração de BSA adsorvida na superfície das membranas em estudo.	46
Figura 4.24: Concentração de BSA adsorvida por unidade de área, nas membranas de PVA, alinhadas (círculos vazios) e não-alinhadas (círculos cheios), com diferentes percentagens de GO (0% - azul escuro; 0.05% - azul claro; e 0.2% - verde) com 3%GDA.	47

Figura 4.25: Concentração de BSA adsorvida por unidade de área na membrana de PVA com 0.2% de GO não-alinhada, com diferentes intensidades de campo: 0T (azul escuro), 0.0832T (azul claro) e 1.198T (verde).	48
Figura 4.26: Membrana de PVA após ensaio de permeação	50
Figura 4.27: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O ₂ para a membrana de PVA sem micropartículas magnéticas.....	50
Figura 4.28: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO ₂ para a membrana de PVA com 0% de GO	51
Figura 4.29: Permeabilidade da membrana de PVA com diferentes percentagens de GO (0%, 0.05% e 0.1%), alinhadas e não-alinhadas, ao O ₂ (a azul) e CO ₂ (a verde), a 30°C.	52
Figura 4.30: Selectividade da membrana de PVA com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05% e 0.1%), preparadas na presença e ausência de campo, ao O ₂ (a azul) e ao CO ₂ (a verde), a 30°C.	53
Figura 8.1: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0% de GO e 3% de agente reticulante (GDA).	A
Figura 8.2: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.05% de GO, alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).	B
Figura 8.3: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.1% GO, alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).	B
Figura 8.4: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.1% GO, não-alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).	B
Figura 8.5: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.2% GO, não-alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).	C
Figura 8.6: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.2% GO, alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).	C
Figura 8.7: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0% de GO e 6% de agente reticulante (GDA).	D
Figura 8.8: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.05% de GO alinhada, e 6% de agente reticulante (GDA).	D
Figura 8.9: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.1% GO, não-alinhada e 6% de agente reticulante (GDA).	E
Figura 8.10: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.1% GO, alinhada e 6% de agente reticulante (GDA).	E
Figura 8.11: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.2% GO, não-alinhada e 6% de agente reticulante (GDA).	E
Figura 8.12: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.2% GO, alinhada e 6% de agente reticulante (GDA).	F
Figura 8.13: Medição de ângulos de contacto da membrana de PVA com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) e concentração constante de GDA (6%), no máximo grau de inchamento na ausência de campo magnético externo.	F

Figura 8.14: Ângulos de contacto do glicerol na superfície de membranas de PVA com 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% de GO e 6%GDA, no máximo grau de inchamento (azul) e presença de campo magnético externo de intensidade 0.0832T (verde), não-alinhadas (círculos a cheio) e alinhadas (círculos vazios).	G
Figura 8.15: Ângulos de contacto do glicerol na superfície de membranas de PVA com 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% de GO e 6%GDA no máximo grau de inchamento (azul) e equilibradas à temperatura e humidade de 50% e T=17°C (verde), não-alinhadas (círculos a cheio) e alinhadas (círculos vazios).	G
Figura 8.16: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O ₂ para a membrana de PVA com 0.05% de GO, não-alinhada.	H
Figura 8.17: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO ₂ para a membrana de PVA com 0.05% de GO, não-alinhada.	H
Figura 8.18: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O ₂ para a membrana de PVA com 0.05% de GO, alinhada.	H
Figura 8.19: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO ₂ para a membrana de PVA com 0.05% de GO, alinhada.	I
Figura 8.20: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O ₂ para a membrana de PVA com 0.1% de GO, não-alinhada.	I
Figura 8.21: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO ₂ para a membrana de PVA com 0.1% de GO, não-alinhada.	I
Figura 8.22: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO ₂ para a membrana de PVA com 0.1% de GO, alinhada.	J
Figura 8.23: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O ₂ para a membrana de PVA com 0.1% de GO, alinhada.	J

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Propriedades físicas do PVA [21][22].	7
Tabela 3.1: Reagentes utilizados para a produção de membranas densas magnéticas de PVA com GO.	11
Tabela 3.2: Composição química das membranas preparadas na presença (alinhadas) e na ausência (não alinhadas) de campo magnético, utilizadas neste trabalho.	13
Tabela 4.1: Membranas preparadas na ausência de campo magnético com diferentes tempos de sonicação. Imagens obtidas por microscópio com ampliação 4x e zoom 362mm.	28
Tabela 4.2: Membranas preparadas na presença de campo magnético com diferentes tempos de sonicação. Imagens obtidas por microscópio com ampliação 4x e zoom 362mm.	29
Tabela 4.3: Ângulos de contacto do glicerol em membranas de PVA e membranas de PVA com diferentes percentagens de GO magneticamente alinhado e não-alinhado e de distintas percentagens de GDA.	45
Tabela 4.4: Resultados de permeabilidade e selectividade da membrana de PVA não funcionalizada e funcionalizada com diferentes concentrações de óxido de grafeno a O ₂ e CO ₂ , a 30°C.	51

Lista de abreviaturas e símbolos

CO₂	Dióxido de carbono
GDA	Glutaraldeído
GH	Grau de Hidrólise
GO	Grafeno Oxidado
I	Espessura da membrana (cm)
O₂	Oxigénio
P	Permeabilidade (m ² /s)
P_A	Pressão da alimentação (bar)
P_P	Pressão do permeado (bar)
PVA	Álcool Polivinílico
SEM	Espectroscopia Electrónica de Varrimento
V_A	Volume da alimentação (m ³)
V_P	Volume do permeado (m ³)
β	Parâmetro geométrico da célula de permeação (m ⁻¹)
BSA	Albumina de soro bovino

1. Introdução

Os danos num órgão ou num tecido animal podem ocorrer como uma consequência normal do envelhecimento celular, decorrentes de patologias infecciosas, atípicas, ou de patologias genéticas que leve a deformações congénitas; ou por acções mecânicas e/ou químicas traumáticas directas no órgão ou no tecido, não podendo ser na maior parte das vezes, reparados num processo de regeneração tecidual natural. Para dar resposta a algumas destas situações clínicas, o recurso ao transplante de órgãos ou ao enxerto de tecidos, são soluções muitas vezes utilizadas para dar uma melhor qualidade de vida ao ser humano.

No que diz respeito aos enxertos de tecidos, estes podem ser autólogos, homólogos ou heterólogos, assim tenham proveniência da mesma pessoa, da mesma espécie ou de espécies diferentes, respectivamente. Os dois últimos enxertos têm sempre um carácter temporário e nem sempre são bem aceites pelo organismo receptor. O mesmo ocorre quando se fala de transplantes de órgãos entre indivíduos compatíveis, onde se evidencia a dificuldade em encontrar-se uma histocompatibilidade óptima, para evitar a rejeição imunológica do enxerto/órgão, e a salvaguarda de uma eventual transmissão de doenças [1][2].

De forma a minimizar estes condicionalismos imunológicos e o risco de infecção, iniciaram-se a realização de estudos no âmbito da engenharia de tecidos, que têm conduzido a um aumento do conhecimento das técnicas para a produção e desenvolvimento destes mesmos órgãos e tecidos, em laboratório. Uma das técnicas em desenvolvimento é a utilização de suportes celulares (*scaffolds*), no crescimento de tecidos celulares *in vivo* ou *in vitro*. O uso destes suportes consiste na regeneração controlada de órgãos e tecidos vivos danificados, através da utilização de células da própria pessoa, da mesma espécie ou de espécies diferentes, já referido atrás, sendo estas cultivadas sobre matrizes poliméricas, que posteriormente serão reinseridas no organismo. Estas matrizes poliméricas têm características superficiais, tais como: molhabilidade, pois a adesão celular e a quantidade de proteínas adsorvidas pela superfície é geralmente superior em superfícies hidrofílicas; polaridade, em que as células aderem, preferencialmente a superfícies com carga positiva, e por fim, a morfologia da superfície, em que superfícies porosas apresentam uma área de contacto maior comparativamente com superfícies não porosas, permitindo assim uma maior adsorção de proteínas. Estas características promovem a adesão celular, que suportam o crescimento, proliferação e diferenciação das células, na sua superfície. Esta técnica permite superar as dificuldades da compatibilidade imunológica dos transplantes e enxertos já referenciadas, e minimiza-se a ocorrência de transmissão de doenças/infecções.

Para que ocorra regeneração tecidual, estes suportes têm que satisfazer determinados critérios relacionados com o material utilizado, tais como: terem elevada porosidade para o crescimento e proliferação das células e transporte de gases; terem propriedades de superfície

apropriadas para a fixação, proliferação e diferenciação das células, como já descrito anteriormente, e por fim; propriedades mecânicas tais como a resistência e o módulo de rigidez, as quais deverão ser semelhantes às do tecido que se pretende produzir. O suporte de tecido celular deve também possuir uma taxa de degradação adequada e ser biocompatível com o tecido onde será inserido [2][3].

A nanotecnologia é uma área que tem vindo a ser alvo de interesse na comunidade científica [3]. O desenvolvimento da ciência dos materiais permitiu obter materiais nanoestruturados com propriedades benéficas e potenciais em diversas áreas científicas e tecnológicas, tais como o desenvolvimento de sensores biológicos, libertação controlada de fármacos e engenharia de tecidos [4]. A nanotecnologia envolve processos, materiais e produtos numa escala de 1 a 100 nanómetros, favorecendo a indústria farmacêutica, cosmética, segmentos médico-hospitalar, biotecnológico, entre outras [4].

Devido à sua estrutura lamelar e biocompatibilidade [5], o grafeno têm atraído a atenção de químicos, físicos entre outras áreas, sendo a medicina e a biologia áreas destinadas para a sua aplicação. O grafeno e os seus derivados, tais como o óxido de grafeno (GO), têm sido estudados, sendo intitulados de “materiais excepcionais”, pelas suas propriedades físicas e químicas, tais como [6]:

- Elevada densidade de grupos funcionais de O_2 ;
- Pode ser disperso em água;
- É pouco permeável a gases;
- Tem propriedades de fluorescência, podendo ser utilizado em biossensores, com o objectivo de detectar proteínas e DNA;
- Não é tóxico.

Recentemente foram efectuados estudos *in vitro*, os quais indicaram que nanomateriais à base de grafeno, como nanotubos de carbono e óxido de grafeno, promovem a adesão, crescimento, diferenciação e expansão de células estaminais. Embora o óxido de grafeno seja descrito como um isolante eléctrico devido ao rompimento das suas redes de ligação sp^2 , uma das vantagens da utilização deste material, é a sua facilidade em dispersar-se na água (ou seja, a sua hidrofiliabilidade) e em solventes orgânicos, bem como em matrizes, devido à presença de grupos funcionais de oxigénio polares [7].

De entre os vários materiais poliméricos existentes, o álcool polivinilo (PVA) tem sido o mais utilizado como material de implante em aplicações biomédicas tais como: membranas usadas em processos de diálise, excertos, *tissue scaffolds* e libertação controlada de fármacos. Este material polimérico tem sido o mais explorado devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas, como flexibilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade [8].

As características, anteriormente relacionadas, do GO e do PVA, são as que nortearam e justificaram o interesse deste trabalho, sendo o estudo de um sistema de hidrogel à base de GO/PVA, quimicamente reticulado com glutaraldeído (GDA), que possibilite o desenvolvimento de scaffolds.

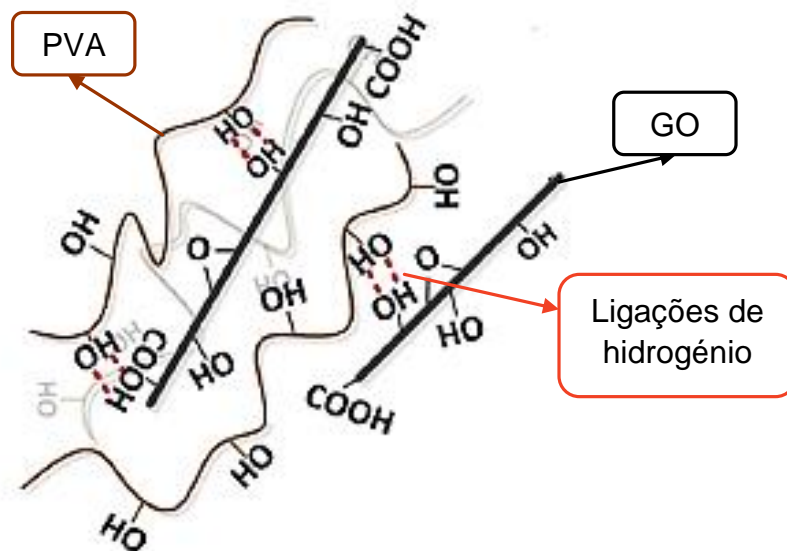


Figura 1.1. Ligação química do GO ao PVA. Adaptado de [9].

Com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de aplicações biomédicas, este trabalho centrou-se na preparação e caracterização de membranas magnéticas de PVA com micropartículas lamelares de óxido de grafeno (GO), os quais foram modificados por adição de Fe_3O_4 , tendo a capacidade de responder a campo magnético. Estas membranas foram caracterizadas através de estudos sob a estrutura, a morfologia, o efeito de inchamento, adsorção de proteínas e o transporte gasoso, nos mesmos. A incorporação destas micropartículas de grafeno é benéfico para o desenvolvimento destas membranas devido ao facto de proporcionarem melhores propriedades mecânicas, eléctricas e transmitir novas propriedades para promover o crescimento celular [10].

2. Revisão bibliográfica

2.1. Hidrogéis e suas aplicações

2.1.1. Hidrogéis

Os hidrogéis são materiais constituídos por estruturas poliméricas tridimensionais e hidrofílicas, que em contacto com água ou fluidos biológicos são capazes de inchar, deformando a sua estrutura, e ao mesmo tempo apresentando uma grande capacidade de absorção de líquidos. Este conjunto de características atribui-lhes propriedades físicas similares às dos tecidos vivos. Os hidrogéis também têm baixa toxicidade, são biocompatíveis e quando em contacto com solventes termodinamicamente compatíveis sofrem transição vítrea, definida como a transição reversível em materiais amorfos entre um estado duro e relativamente rígido e um estado mole e "borrachoso" [11][12].

2.1.1.1. Preparação de hidrogéis

A preparação de hidrogéis envolve a formação de ligações cruzadas de polímeros lineares ou a polimerização simultânea de monómeros monofuncionais, e formação de ligações cruzadas com monómeros polifuncionais. Polímeros sintéticos, semi-sintéticos ou naturais, podem ser utilizados para a síntese dos hidrogéis, tais como polímeros constituídos por grupos laterais (grupos carboxilos, grupos hidroxilos, aminas, entre outros) [13][14].

Os hidrogéis podem ser obtidos através de dois métodos: reticulação química, método usado neste trabalho, e reticulação física, que podem ser utilizadas para a formação de ligações cruzadas nos hidrogéis.

Os hidrogéis obtidos através de reticulação química são chamados de hidrogéis químicos. Neste método, as ligações covalentes estão presentes nas cadeias dos polímeros.

Os hidrogéis obtidos através de reticulação física são provenientes de interações físicas (forças de Van der Waals, pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas ou ligações secundárias), sendo conhecidos como hidrogéis físicos. Os hidrogéis físicos, ao serem submetidos a estímulos externos, tais como a temperatura ou variações de pH, sofrem uma dissolução das suas redes poliméricas. [15][14].

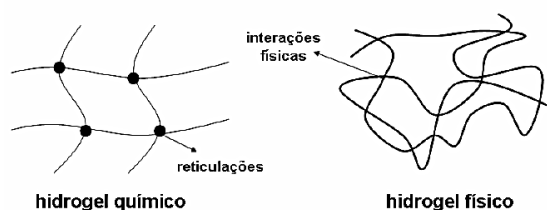


Figura 2.1: Estrutura de hidrogéis químicos e físicos [14].

2.1.1.2. Classificação de hidrogéis

Os hidrogéis podem ser classificados em relação:

- À carga, como neutros ou iônicos, baseando-se na natureza dos grupos laterais presentes [16];
- Estrutura física, tais como amorfos, semi-cristalinos e estrutura supramolecular [17][18];
- À existência de um ou mais monómeros nas redes poliméricas, homopolímeros ou copolímeros respectivamente, sendo que, pelo menos um dos copolímeros seja hidrofílico [17][18].

2.1.1.3. Propriedades físico-químicas dos hidrogéis

A capacidade de inchamento das redes poliméricas é afectada pelo número ligações cruzadas e pela estrutura química dos polímeros. Quanto maior a quantidade de agente reticulante incorporado na estrutura do hidrogel, maior o número de ligações cruzadas, levando a uma estrutura mais rígida. Posto isto, o inchamento será menor comparado com o mesmo hidrogel que apresenta um menor número de ligações cruzadas. Em relação à estrutura química, os polímeros que contenham grupos hidrofílicos tem uma maior capacidade de inchar num meio aquoso, quando comparados com os polímeros que contenham grupos hidrofóbicos, devido ao colapso destes mesmos grupos na presença de água, minimizando a exposição destes à mesma [17].

O processo de inchamento que envolve a absorção de água na matriz polimérica segue os seguintes passos [19]:

- Difusão das moléculas de água para o interior da rede polimérica;
- Relaxamento das cadeias poliméricas com hidratação;
- Expansão da rede polimérica no meio aquoso.

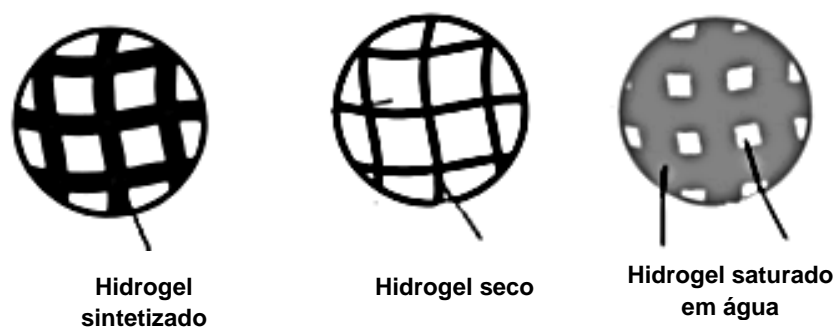


Figura 2.2: Inchamento de hidrogéis [14].

Os hidrógeis apresentam diversas vantagens em diferentes aplicações [19][20]:

- Não serem tóxicos;
- Capacidade de inchamento em água e fluídos biológicos (semelhante aos tecidos vivos);
- Consistência elastomérica, minimizando o atrito entre tecidos e o hidrogel;
- Alta permeabilidade, permitindo o fluxo de fluídos corpóreos pelo hidrogel devido à alta porosidade do polímero;
- Biodegradabilidade.

Uma das desvantagens dos hidrogéis poliméricos para as diferentes aplicações existentes são as suas propriedades mecânicas precárias e tenacidade (energia mecânica, ou seja, o impacto necessário para levar um material à ruptura) após o inchamento do hidrogel [20].

2.2. Álcool polivinílico (PVA)

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero sintético hidrofílico solúvel em água, com uma estrutura relativamente simples, com grupos hidroxilos laterais.

Tabela 2.1: Propriedades físicas do PVA [21][22].

Fórmula molecular	$(C_2H_4O)_x$
Massa molar média (g/mol)	Entre 30.000 e 70.000
Densidade (g/cm³)	1.19-1.31
Ponto de ebulição (°C)	228
Ponto de fusão (°C)	200
Temperatura de transição vítrea – Tg (°C)	75-85
Apresentação	Pó granulado

As propriedades básicas do PVA dependem do grau de polimerização, que corresponde ao número de unidades estruturais repetidas numa macromolécula; e do grau de hidrólise (GH), que é relação entre a percentagem de grupos hidroxilos (grupos hidrofílicos) no polímero final e o número de grupos acetato iniciais. A existência de grupos hidroxilo (-OH) na cadeia polimérica pode alterar a hidrofiliidade do polímero, aumentando-a. Para além disso, o PVA exibe uma boa estabilidade térmica e mecânica, tornando-o atractivo na síntese de membranas poliméricas para fins biomédicos. Usualmente, o PVA com GH $\geq 98.5\%$ é solúvel em água apenas a temperaturas superiores a 70°C, prática esta, a mais usada para a preparação da solução [23].

- Modelo de reticulação química com Glutaraldeído (GDA)

Por vezes, as matrizes de PVA necessitam de ser alteradas para melhorar as suas propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas e para haver uma diminuição na solubilidade deste polímero em soluções aquosas [24].

A estrutura das matrizes poliméricas pode sofrer modificações através de técnicas como a co-polimerização (junção de diferentes polímeros) ou na aplicação de agentes de reticulação [25].

A reticulação é a técnica mais usada para se estabilizar as membranas de PVA, podendo influenciar a selectividade e a permeabilidade da membrana [26]. Esta técnica ocorre devido à reacção existente entre o agente reticulante em uso e os grupos hidroxilo existentes no PVA.

O agente reticulante usado neste trabalho foi o glutaraldeído (GDA), existindo outros como o acetaldeído, formaldeído e outros monoaldeídos [27]. A estrutura reticulada do PVA usando o glutaraldeído, provém da reacção entre os grupos hidroxilos e os grupos aldeído do glutaraldeído na presença de um catalisador ácido (neste caso, o ácido clorídrico) [28], formando-se pontes acetais (ligações entre um átomo de carbono e dois átomos de oxigénio por meio de ligações covalentes simples) entre o grupo hidroxilo do PVA e o agente reticulante [29].

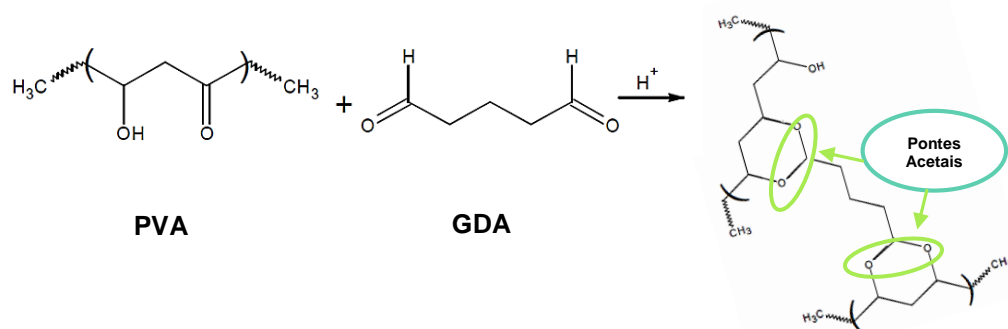


Figura 2.3: Pontes acetais resultantes da reacção de PVA com GDA. Adaptado de [29].

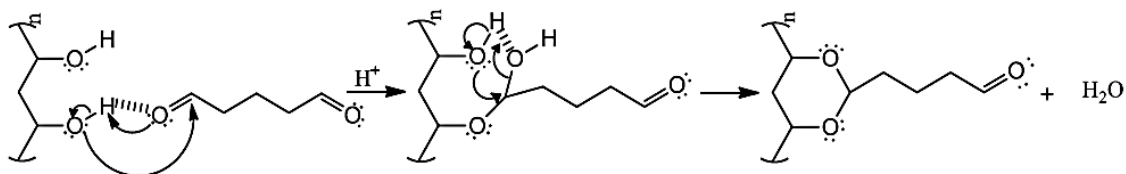


Figura 2.4: Mecanismo da reacção de acetalização do PVA com glutaraldeído. Adaptado de [30].

A Figura 2.5 ilustra a formação das pontes acetais depois da reticulação do PVA com GDA.

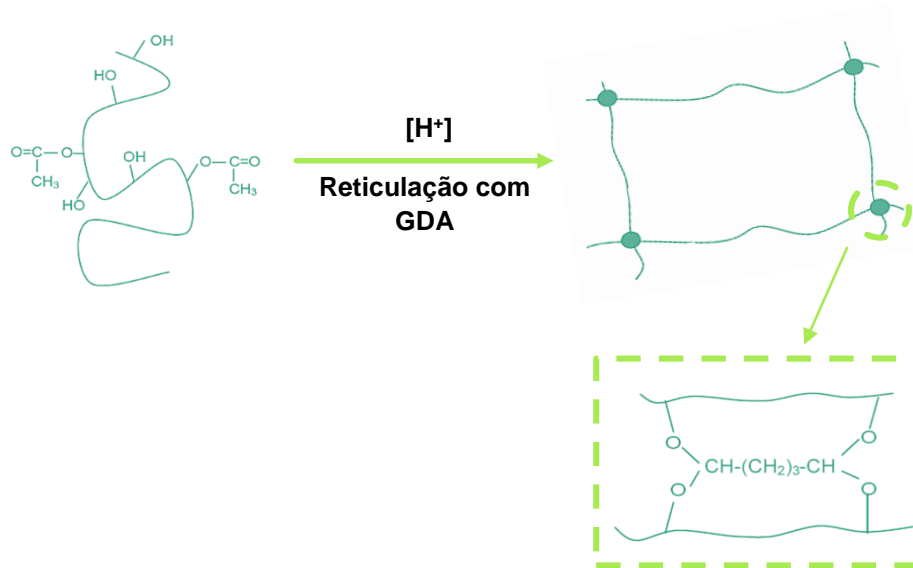


Figura 2.5: Reação do PVA com o GDA catalisada por um ácido. Adaptado de [29].

O PVA é um dos poucos polímeros semi-cristalinos solúveis em água, com boas características interfaciais, comparativamente com outros polímeros conhecidos. Por estas boas características, o PVA é um dos polímeros mais utilizados em diversas aplicações, tais como [31]:

- Aplicações industriais, funcionando como um excelente adesivo possuindo uma boa resistência a solventes e óleos;
- Indústria têxtil e de papel;
- Indústria farmacêutica, para sistemas de liberação controlada de fármacos;
- Aplicações biomédicas utilizado para cartilagem artificial e mais recentemente usado para o desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecidos sendo geralmente considerado biocompatível.

2.3. Engenharia de tecidos

O aumento da esperança e melhor qualidade de vida criou a necessidade de serem desenvolvidas alternativas para a reparação ou substituição de tecidos vivos ou órgãos gravemente danificados [10][32].

A Engenharia de Tecidos é uma área de desenvolvimento científico que permite a substituição, regeneração ou reparação de tecidos ou órgãos. Estes tecidos são dissociados em células, e por sua vez, estas são cultivadas em suportes biológicos ou sintéticos. Estes suportes biológicos são conhecidos como *scaffolds* (suportes, estruturas tridimensionais, entre outros) [33].

A preparação dos produtos de engenharia de tecidos segue as seguintes etapas: selecção e processamento do suporte polimérico em uso, inoculação da população celular sobre o *scaffolds*, crescimento do tecido prematuro, crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico, reimplante cirúrgico e por fim, a simulação do produto. Estas etapas estão representadas na Figura 2.6.

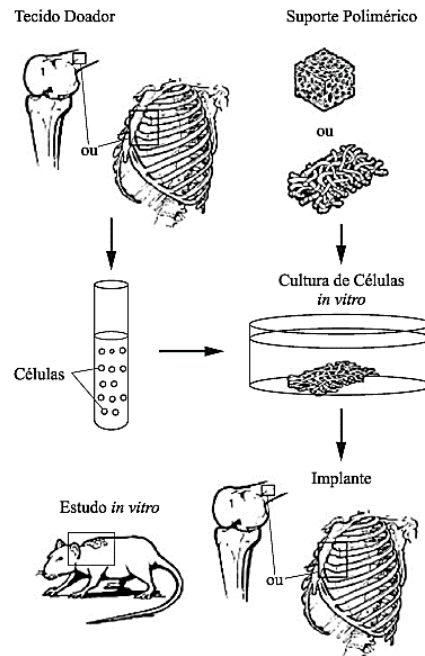


Figura 2.6: Engenharia de tecidos. Adaptado de [34].

Os suportes poliméricos permitem a penetração das células e nutrientes, como também a fixação, proliferação e crescimento destas mesmas. Para tal, têm de ter propriedades essenciais tais como a resistência mecânica para suportar a pressão hidrostática, mantendo a uma estrutura adequada para a proliferação celular; biodegradabilidade apropriada para que a taxa de degradação esteja ajustada à taxa de crescimento do novo tecido; biocompatibilidade para evitar infecções e respostas imunes; elevada porosidade e interconectividade dos poros para que seja possível ocorrer difusão de gases e nutrientes, e por fim propriedades químicas superficiais adequadas para permitir a adesão das células e a sua proliferação.

O suporte degrada-se enquanto um novo órgão ou tecido é formado. No desenvolvimento e na selecção desses materiais, o tempo de degradação é fundamental para o sucesso do implante. Os estudos e os desafios actuais são normalmente direccionados ao entendimento das relações entre composição química e morfologia do suporte [1][29].

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes utilizados

Neste trabalho, foram preparadas membranas magnéticas de álcool polivinílico (PVA) com diferentes percentagens de óxido de grafeno (GO) modificado por adição de Fe_3O_4 , obtido e gentilmente fornecido pelo grupo do professor Adélio Mendes da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. O modo de preparação do GO encontra-se descrito em anexo (Anexo I). À matriz polimérica foi ainda adicionado glicerol como plastificante, para uma maior maleabilidade da membrana, glutaraldeído (GDA) como agente reticulante e ácido clorídrico como catalisador ácido.

Na Tabela 3.1 estão apresentados todos os reagentes utilizados para a preparação das membranas densas com a respectiva fórmula molecular, peso molecular e fabricante.

Tabela 3.1: Reagentes utilizados para a produção de membranas densas magnéticas de PVA com GO.

	Reagentes	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Fabricante
Preparação de membranas	Álcool Polivinílico (Mowiol® 28-99% m/m)	$(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$	Entre 30.000 e 70.000	Sigma-Aldrich
				CAS: 9002-89-5
	Glicerol (<i>Glycerol, solution</i> 86-88% v/v, reagent grade, ISO)	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	92.10	Scharlau
				CAS: 56-81-5
	Glutaraldeído (<i>Glutaraldehyde solution, Grade II, 25% v/v</i>)	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	100.12	Sigma-Aldrich
				CAS: 203-856-5
	Ácido Clorídrico (<i>Hydrochloric acid, 36.5-38% v/v</i>)	HCl	36.46	Scharlau
				CAS: 7647-01-0

3.2. Funcionalização de membranas de hidrogel com resposta magnética

3.2.1. Preparação de membranas magnéticas de PVA

As membranas de hidrogel foram preparadas por dissolução de 8% (m/v) de PVA, sob agitação magnética, a uma temperatura de 80°C. Após dissolução do polímero, adicionou-se 2% (v/v) de glicerol à solução. A solução foi arrefecida num frigorífico a 4°C. Para avaliar o efeito do agente reticulante na capacidade de resposta a campo magnético, foram preparadas membranas com diferentes percentagens de agente reticulante, 3 e 6%, numa proporção idêntica à de catalisador ácido.

Após o procedimento acima descrito, a solução foi transferida para placas redondas de vidro. O polímero reticulou a uma temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e humidade $45\pm 5\%$ ambiente durante aproximadamente, 30 minutos. Após gelificação do polímero, a placa redonda foi colocada num exsiccador com humidade e temperatura controlada, de 50% a 17°C . Para controlar a humidade, foi usada uma solução salina de cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).



Figura 3.1: Membrana de PVA.

Para conferir propriedades magnéticas às membranas em estudo, foram adicionadas diferentes concentrações de GO. Prepararam-se previamente, três concentrações distintas de grafeno: 0.05%, 0.1% e 0.2% (m/v). Para garantir uma boa distribuição de GO na matriz polimérica, foram preparadas soluções aquosas de GO, as quais foram submetidas a um banho de ultrasons durante duas horas.

Após a dissolução do polímero foram adicionadas as três concentrações de GO dispersas em 5mL de água, dando origem à solução final. Esta solução foi submetida a um banho de ultrasons durante três horas, para maior homogeneização e dispersão dos grafenos na matriz polimérica. De seguida, foi adicionado à solução 2% (v/v) de glicerol. A solução foi arrefecida num frigorífico a 4°C , durante 15 minutos aproximadamente. Após este procedimento foi adicionado à solução diferentes percentagens de agente reticulante, 3 e 6%, numa proporção idêntica de catalisador ácido, colocando-a numa placa redonda de vidro, para gelificar à temperatura ($20;25^{\circ}\text{C}$) e humidade ($40;50\%$) ambiente, durante 30 minutos, aproximadamente. A membrana foi posteriormente conservada num exsiccador a humidade e temperatura controlada (50% a $T=17^{\circ}\text{C}$).

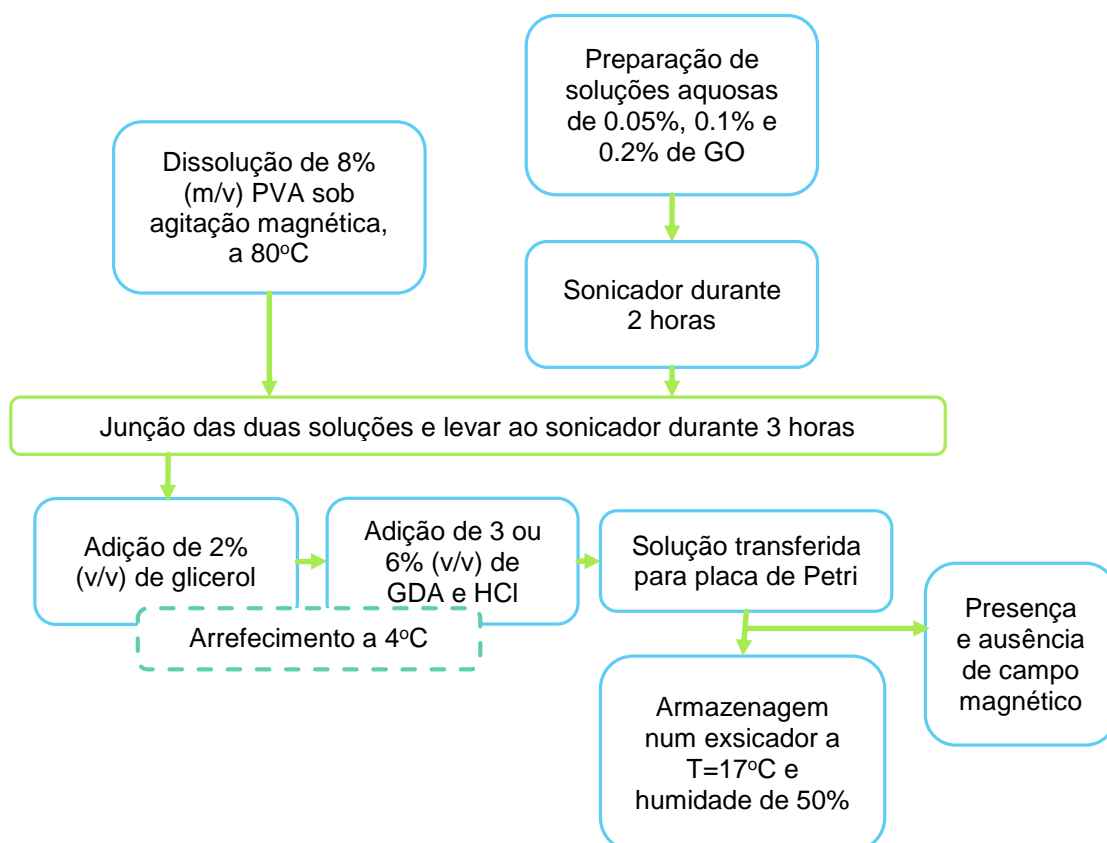


Figura 3.1: Preparação de membranas poliméricas de PVA com micropartículas de GO.

Foram preparadas membranas com diferentes percentagens de GO (0%, 0.05% 0.1% e 0.2%), e reticuladas na presença (alinhadas) e ausência (não alinhadas) de campo magnético, como se encontra descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Composição química das membranas preparadas na presença (alinhadas) e na ausência (não alinhadas) de campo magnético, utilizadas neste trabalho.

Membranas		%GO	%Glicerol	%GDA	%HCl
PVA		0	2%	3%	3%
				6%	6%
PVA + GO	Alinhadas	0.05%		3%	3%
				6%	6%
	Não-alinhadas			3%	3%
				6%	6%
	Alinhadas	0.1%		3%	3%
	Não-alinhadas			6%	6%
	Alinhadas	0.2%		3%	3%
	Não-alinhadas				

A intensidade de campo magnético variou ao longo da distância (y), como se pode observar na Figura 3.2, e foi medida através do uso de um Gaussímetro.

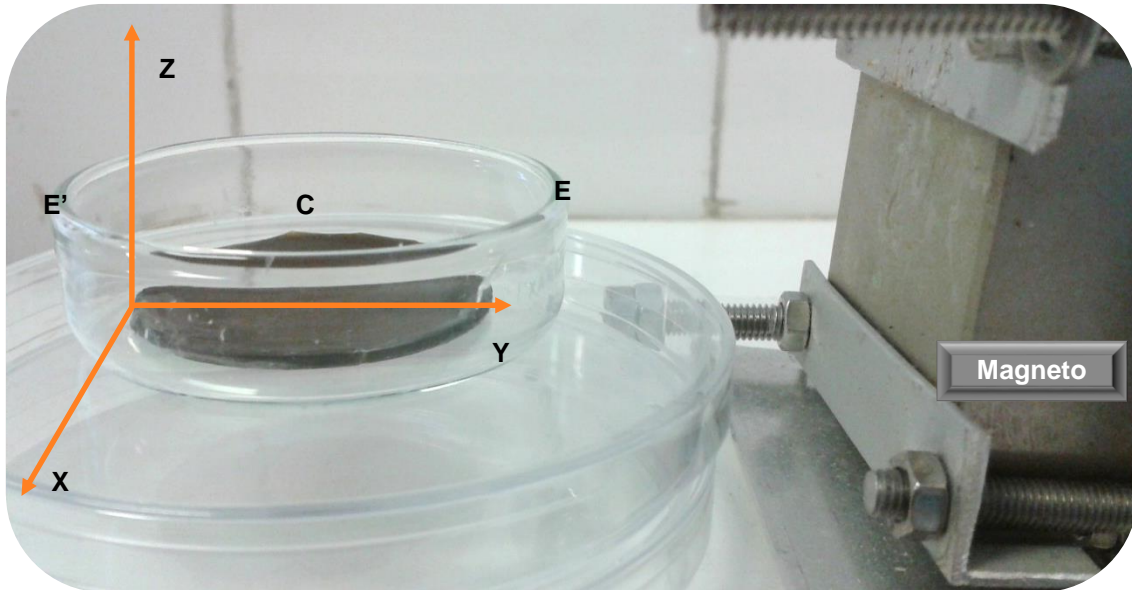


Figura 3.2: Variação da intensidade de campo magnético em relação à distância (E - Extremidade mais próxima do magneto; C – centro da placa e E' – Extremidade mais afastada do magneto).

As membranas com GOs, ao serem submetidas a uma intensidade de campo magnético superior a 0.118T ocorre uma migração não desejada das micropartículas de grafeno, com o consequente aumento da sua concentração na extremidade proximal ao magneto indutor de campo magnético. Em contrapartida, a utilização de uma intensidade de campo magnético inferior a 0.014T, não permitiu o alinhamento orientado das micropartículas. Para que houvesse uma boa dispersão homogênea e orientação destas micropartículas na matriz polimérica, foi então necessário seleccionar um valor médio de intensidade de campo mais adequado à existência de um equilíbrio entre os dois factores referidos. Esse valor de intensidade de campo médio foi aproximadamente de 0.0235T, sendo a distância central das duas placas redondas, onde foi depositado as soluções de polímero, com diferentes dimensões utilizadas, a mesma. Na Figura 3.3 está representado o perfil de intensidade de campo magnético pela membrana. A intensidade de campo foi medida através do uso de um gaussímetro.

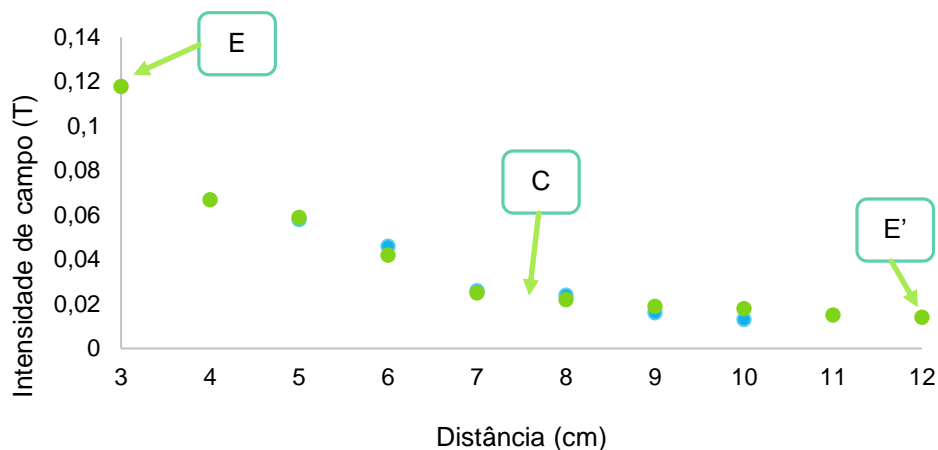


Figura 3.3: Variação de intensidade de campo magnético com a distância ao magneto. (E - Extremidade mais próxima do magneto; C – centro da placa; E' – Extremidade mais afastada do magneto; Pontos azuis-claros – placa redonda menor (d=5cm); Pontos verdes – placa redonda maior (d=10cm)).

3.3. Caracterização estrutural de membranas de hidrogel

Neste trabalho foram realizados diversos estudos, de forma a analisar a influência da incorporação de GOs e o seu comportamento magnético na estrutura e topografia das membranas. Para tal, realizaram-se estudos de microscopia óptica e electrónica de varrimento (SEM).

3.3.1. Microscopia Óptica

A análise da dispersão de grafenos nas membranas poliméricas foi realizada por análise microscópica óptica destas mesmas. Foi utilizado um microscópio óptico *Olympus BH-2*, tendo sido usadas as objectivas com ampliações 4x e 10x. As imagens foram tiradas com o auxílio de uma máquina fotográfica *Canon EX-F1 Exilim*, utilizando um zoom igual a 362mm.



Figura 3.4: Microscópio *Olympus* e máquina fotográfica *Canon*.

3.3.2. Análise morfológica de membranas de hidrogel através de microscopia electrónica de varrimento (SEM)

Microscopia electrónica de varrimento (Scanning Electron Microscope - SEM) é uma técnica que permite avaliar a morfologia e a distribuição dos GOs na membrana polimérica de PVA. As membranas foram cortadas com N₂ líquido, sendo revestidas com uma fina camada de carbono, devido ao facto da membrana não ser um material condutivo. As membranas são revestidas para prevenir a acumulação de campos eléctricos estáticos nestas mesmas, devido à irradiação eléctrica durante a produção da imagem, e por fim, para melhorar o seu contraste quando esta está a ser visualizada no equipamento [35]. Esta técnica foi elaborada através de um Microscópio Electrónico de Varrimento (SEM) do Instituto Superior Técnico de Lisboa, com o apoio da técnica Doutora Isabel Nogueira. As observações foram efectuadas através do FEG/SEM da marca *Hitachi* modelo S 240 e com uma energia do feixe de 15 kV.

3.4. Avaliação da estabilidade estrutural e química das membranas de hidrogel

Para avaliar a estabilidade das membranas de hidrogel por incorporação de micropartículas de óxido de grafeno, foram realizados estudos de inchamento e estudos de degradação.

Durante a avaliação estrutural das membranas, foi necessário proceder-se a ensaios de lavagem das membranas em estudo. Este processo consistiu na imersão das membranas, durante um período de 35 horas, sendo o meio líquido renovado de 24 em 24 horas. O objectivo deste estudo foi verificar se haveria a libertação de compostos da matriz polimérica por inchamento desta, analisando o sobrenadante (meio líquido onde as membranas foram imersas) através de espectrofotometria UV-Visível, com intervalo de comprimento de onda de [200;500] nm.

3.4.1. Estudo de inchamento de hidrogéis

Os hidrogéis, como por exemplo o PVA usado neste trabalho, são estruturas tridimensionais poliméricas com aparência sólida. Devido aos grupos hidrofílicos presentes nas cadeias poliméricas dos hidrogéis, estes têm a capacidade de inchar em água. O agente reticulante evita a dissolução do polímero no meio líquido, mas também confere resistência mecânica aos hidrogéis [36].

Este estudo permite determinar o grau de inchamento de qualquer rede polimérica. O grau de inchamento indica a capacidade de alteração estrutural do material por absorção de água [37]. A capacidade de inchamento depende da natureza química do polímero, do grau de reticulação, da mudança de pH, da temperatura e do seu carácter hidrofílico. Tendo sido a água

o solvente utilizado, as propriedades de inchamento podem ser explicadas em detalhe com um mecanismo de transferência de solvente em uso, que pode ocorrer por difusão [20].

No presente trabalho, o grau de inchamento foi determinado através da pesagem das membranas equilibradas (massa inicial – m_i) e posteriormente imersas em água destilada, durante duas horas em condições ambientais. De seguida, as membranas imersas foram novamente pesadas (massa final – m_f) [36]. Também foi determinado a variação de volume das membranas através da área e da espessura destas. No final do estudo, as membranas foram equilibradas no exsicador (50% de humidade e $T=17^\circ\text{C}$).

O grau de inchamento e a variação do volume das membranas foram calculados pelas equações seguintes [36]:

$$\text{Grau de inchamento (\%)} = \frac{m_f}{m_i} \times 100$$

Equação 1

$$\text{Variação de volume (\%)} = \frac{v_f}{v_i} \times 100$$

Equação 2

$$V_{\text{membrana}} = \pi \times r^2 \times \text{espessura}$$

Equação 3

3.4.2. Estudo de degradação de hidrogéis

A degradação é o processo pelo qual existe deterioração nas propriedades de um polímero, devido a factores de origem química, térmica ou mecânica. A degradação pode ser resultado de actividades químicas tais como: dessorção, hidrólise, oxidação, bem como actividades físicas que podem deteriorar a matriz polimérica como a difusão, quebra mecânica entre outras. A forma mais fácil de avaliar o efeito da degradação é através da avaliação da perda de massa que normalmente ocorre pela despolimerização da cadeia polimérica, devido à exposição do polímero a temperaturas elevadas, a produtos químicos ou à humidade [38].

Após a produção das membranas, terem sofrido o processo de lavagem e terem sido equilibradas no exsicador, estas foram imersas numa solução tampão fosfato (PBS) 0.01M (utilizando como sais o KH_2PO_4 e K_2HPO_4), colocadas em recipientes, mantidos a uma agitação de 500 RPM, a 37°C e a $\text{pH}=6.9$ durante 28 dias, renovando a solução de 24 em 24 horas para manutenção do pH, evitando a degradação acelerada. As amostras foram avaliadas quanto à alteração de peso molecular e ao sobrenadante, através de UV-Visível. A temperatura e o pH utilizado nestes ensaios procuraram simular o meio fisiológico do corpo humano.

3.5. Análise do efeito da presença de óxido de grafeno nas propriedades da superfície das membranas, por determinação dos ângulos de contacto

Estes estudos tiveram como objectivo analisar a morfologia da superfície da membrana através da análise do ângulo de contacto, entre uma gota de glicerol e a superfície de cada membrana. Possíveis variações dos ângulos de contacto podem ser devidas a alterações da rugosidade e química superficial, quer pela presença de GOs, quer devido à sua mobilidade quando na presença de um campo magnético externo.

Para a realização desta técnica, utilizou-se um Goniómetro e o respectivo *software* CAM100 da KSV *Instruments*, utilizando uma agulha com um diâmetro de lúmen igual a 0.8162 mm (21 *gauge*). No início deste estudo utilizou-se água como solvente, no entanto, devido ao elevado grau de hidrofiliçidade da membrana, a gota de água era rapidamente adsorvida pela matriz polimérica, pelo que não foi possível obter uma gota estável na superfície da membrana que permitisse a realização das medidas. Deste modo, optou-se por utilizar o glicerol $\geq 99\%$ v/v como fase líquida, o qual possui uma tensão superficial inferior à da água ($\gamma_{\text{glicerol}}=63.4 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_{\text{água}}=72.8 \text{ mJ/m}^2$) [39].

O método *Sessile Drop* usado baseia-se na recolha de imagens da região de contacto entre a gota e a superfície da membrana, que são realizados por uma câmara de vídeo incorporada, no equipamento, já referenciado. Os ângulos de contacto foram determinados através da captura prévia de 70 imagens por gota, que simultaneamente foram analisados pelo *software* CAM 100, ao longo de 7 segundos. Ao longo deste período de tempo foram obtidos valores de ângulos, que permitiram traçar o perfil da variação dos ângulos de contacto entre a gota e a superfície da membrana. O valor dos ângulos de contacto foi adquirido através da média dos valores obtidos, após a estabilização da gota na superfície da membrana. Efectuaram-se no mínimo 5 medições por cada amostra, sendo o valor utilizado, a média das medições totais.

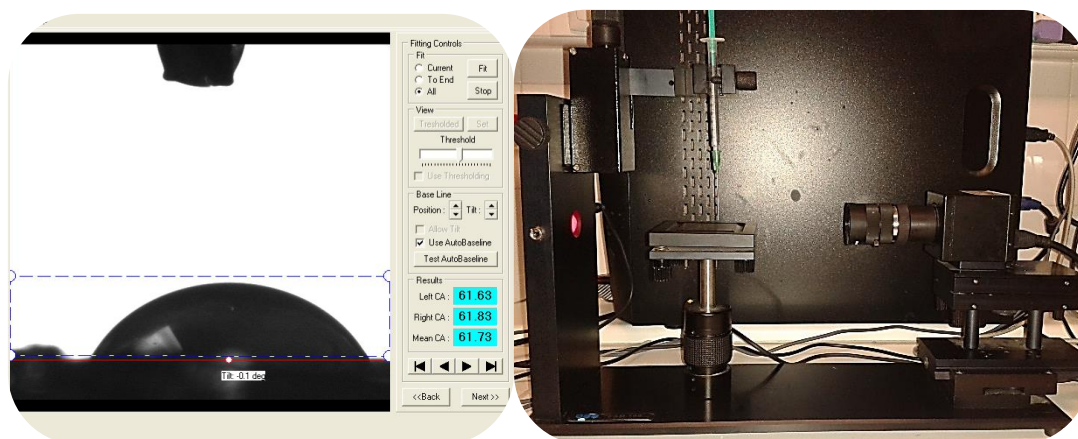


Figura 3.5: Software CAM 100 e Goniómetro

Os ângulos de contacto foram analisados em membranas com diferentes concentrações de GO, com e sem orientação e com diferentes concentrações de agente reticulante.

Estes ângulos foram determinados na ausência de campo magnético em superfícies de membranas saturadas com água, após a sua imersão durante 180 minutos, e superfícies com um grau de humidade que resultou do equilíbrio estabelecido entre a membrana e uma atmosfera com humidade e temperatura controladas a 50% e 17 °C, respectivamente. Por fim foram determinados ângulos na presença de campo magnético, com intensidade igual a 0.0832T e direcção perpendicular à superfície de membranas saturadas com água.

3.6. Adsorção de proteínas em membranas magnéticas

A adsorção é o processo responsável pela adesão de moléculas de um fluido (denominado por adsorvido) a uma superfície sólida (o adsorvente). Um dos primeiros fenómenos que ocorre quando um filme polimérico entra em contacto com um fluido biológico, é a adsorção de proteínas, na superfície dos mesmos [40]. O grau de adsorção depende da pressão, da área superficial, e por fim, da temperatura [41].

Uma das proteínas mais utilizada em estudos de adsorção em superfícies de membranas é a albumina de soro bovino (BSA), tendo como função o controle da pressão osmótica e o transporte de ácidos gordos livres no sangue [40]. É a proteína em maior quantidade no sangue bovino (50 mg/ml) e apresenta uma estrutura semelhante à albumina de soro humano (HSA), apresentando 76% de sequências idênticas de aminoácidos.

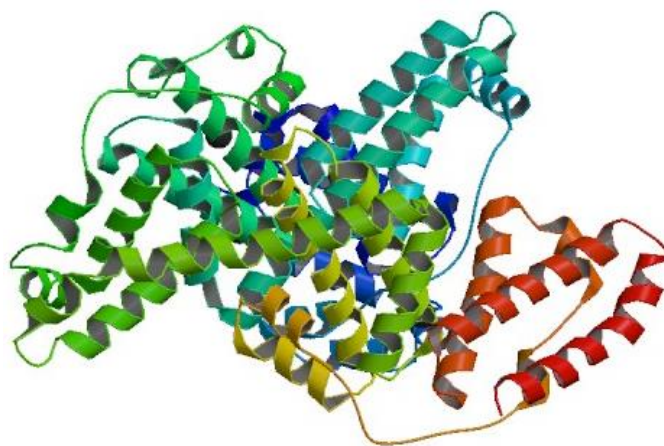


Figura 3.6: Estrutura cristalina da BSA.[42]

Esta proteína é usada devido ao conhecimento de sua estrutura, da sua função e do seu baixo custo. Tem uma massa molecular de 66,430 g/mol [43] e tem um ponto isoelétrico igual a 4,8 [44]. Este indica o pH no qual uma molécula (proteína ou aminoácido) se apresenta com a mesma quantidade de carga positiva e negativa. A BSA é uma proteína que consegue alterar

facilmente a sua conformação e estrutura, principalmente quando não se encontra em condições fisiológicas, dando origem a dois isómeros, são estes: o *fast* (F) a pH igual 4.3 e o *extended* (E) a pH inferiores a 3 [43][45].

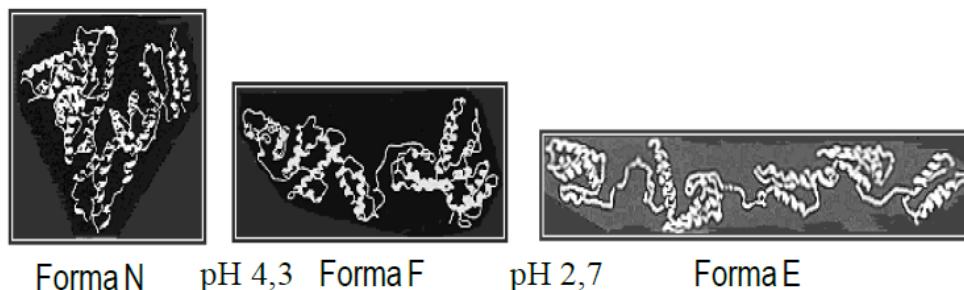


Figura 3.7: Isomerização conformacional da BSA.[45]

Estes ensaios tiveram como objectivo verificar o efeito do conteúdo magnético existente nas membranas alinhadas e não-alinhadas, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05% e 0.2%) e 3% de GDA, no desempenho da adsorção de BSA. As membranas em estudo foram cortadas com uma dimensão de 3 cm² (3 cm x 1 cm), sendo posteriormente imersas, durante 1 hora, em solução tampão fosfato PBS 0.01M a pH 7.4, até atingirem o estado máximo de saturação. Após este período de tempo, estas foram transferidas para tubos de ensaio de plástico, com 5mL de solução de BSA 1 g/L, durante aproximadamente 5 horas, a 25°C e a pH igual a 7.4. Cada solução foi submetida a diferentes intensidades de campo magnético: 0T, 0.0832T e 1.198T.

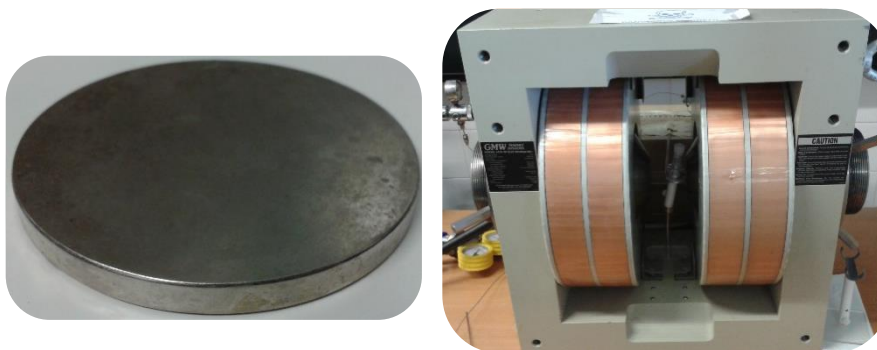


Figura 3.8: Equipamento indutor de campo magnético. Magneto circular: intensidade de 0.0832T e Electromagnetos: intensidade de 1.198T.

Para análise de resultados, efectuou-se a leitura da concentração da proteína restante, através de espectroscopia UV-Visível, ajustando o comprimento de onda para 280 nm, verificando a absorvância e relacionando-se com a concentração através da recta de calibração. Esta recta foi construída através da preparação da solução de BSA e sua diluição, em 0.1; 0.25; 0.5; e 0.75 g/L. As absorvâncias das soluções diluídas foram medidas a 280 nm.

3.7. Impacto da presença de óxido de grafenos (GOs) e do seu comportamento magnético no transporte de gases através das membranas de hidrogel funcionalizadas

Objectivando o uso destas membranas poliméricas para diversas aplicações biomédicas, já referidas atrás, estes deverão permitir a difusão de nutrientes factores de crescimento e gases, designadamente O_2 e CO_2 .

Para entender o efeito da presença dos GOs e a sua orientação (ou alinhamento) na matriz polimérica, na permeabilidade e selectividade da membrana, foram realizados ensaios de transporte gasoso, usando O_2 e CO_2 , como gases de estudo. Foram testadas membranas de PVA, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05% e 0.1%), a uma temperatura de 30°C. Os ensaios de transporte gasoso foram efectuados na célula de permeação apresentados na Figura 3.9.



Figura 3.9: Instalação e célula de permeação.

O sistema é composto por dois compartimentos de igual volume em aço inox, um banho termostatizado (Termostato *Haake* C10, Alemanha), dois transdutores de pressão localizados em cada um dos compartimentos (*Druck*, PCDR 910 modelos 99166 e 991675, Reino Unido), um computador, no qual os resultados são adquiridos pelo *software*, e por fim, uma placa de aquisição de dados (*National Instruments* – NI USB-6009). Os dois compartimentos (alimentação e permeado) são separados por uma membrana com um diâmetro igual a 3 cm. O procedimento experimental consistiu na pressurização de ambos os compartimentos com os gases em estudo, durante um certo intervalo de tempo. De seguida, promoveu-se uma força motriz através da aplicação de uma diferença de pressão entre os dois compartimentos de 0.4 bar, aproximadamente, por abertura da válvula do compartimento do permeado. Esta válvula foi novamente fechada após a redução da pressão a 0.020 bar. A evolução da pressão de cada compartimento é medida ao longo do tempo, pelos transdutores de pressão.

A descrição matemática do transporte pode ser utilizada correlacionando a diferença de concentração ao longo do espaço de um determinado componente i com o seu fluxo J_i ($cm^3 \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$), pela seguinte equação [41]:

$$J_i = -D_i \times \frac{\partial C}{\partial x}$$

Equação 4

Onde:

- $\frac{\partial C}{\partial x}$ é o gradiente de potencial químico do componente i ;
- D_i ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) é o coeficiente de difusão.

Fazendo o balanço de massa a cada um dos compartimentos:

$$V_A \times \frac{\partial C_A}{\partial t} = -A \times J_i$$

$$V_P \times \frac{\partial C_P}{\partial t} = A \times J_i$$

Onde:

- A é a área da membrana,
- V_A e V_P são o volume do compartimento da alimentação e do permeado, respectivamente.
- $\frac{\partial C_A}{\partial x}$ e $\frac{\partial C_P}{\partial x}$ são os potenciais químicos no compartimento da alimentação e do permeado, respectivamente.

Dividindo cada uma das equações por V_A e V_P :

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = -\frac{A \times j}{V_A}$$

$$\frac{\partial C_P}{\partial t} = \frac{A \times j}{V_P}$$

Subtraindo as duas equações tem-se:

$$\Leftrightarrow \frac{\partial C_A}{\partial t} - \frac{\partial C_P}{\partial t} = -\frac{A \times j}{V_A} - \frac{A \times j}{V_P} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{\partial C_A}{\partial t} - \frac{\partial C_P}{\partial t} = A \left(-\frac{1}{V_A} - \frac{1}{V_P} \right) \times j \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \left[\frac{\partial C_A}{\partial t} - \frac{\partial C_P}{\partial t} = -A \left(\frac{1}{V_A} + \frac{1}{V_P} \right) \times j \right]$$

Substituindo j por:

$$j = \frac{D}{l} (C_A - C_P)$$

Equação 5

Onde:

- j é o fluxo de gás através da membrana ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$);
- D é o coeficiente de difusão (cm^2/s);
- H é o coeficiente de partição;
- l é a espessura da membrana (cm).

$$\Leftrightarrow \left[\frac{\partial C_A}{\partial t} - \frac{\partial C_P}{\partial t} = -A \left(\frac{1}{V_A} + \frac{1}{V_P} \right) \times \frac{D}{l} (C_A - C_P) \right] \Leftrightarrow$$

Considerando que:

$$\beta = A_{\text{membrana}} \left(\frac{1}{V_A} + \frac{1}{V_P} \right)$$

$$\begin{aligned} \Leftrightarrow \frac{\partial C_A}{\partial t} - \frac{\partial C_P}{\partial t} &= \frac{D \times \beta}{l} (C_A - C_P) \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \frac{\partial}{\partial t} (C_A - C_P) &= \frac{D \times \beta}{l} (C_A - C_P) \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \frac{\partial (C_A - C_P)}{C_P - C_A} &= \frac{D \times \beta}{l} \times \partial t \Leftrightarrow \end{aligned}$$

Integrando a equação: $t=0 \rightarrow C_A - C_P = C_A^0 - C_P^0$

$$\begin{aligned} \Leftrightarrow \int \frac{1}{C_A - C_P} \partial (C_A - C_P) &= \int_0^t \frac{D \times \beta}{l} \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \int \frac{1}{C_A - C_P} &= \frac{D \times \beta}{l} \times t \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow [\ln(C_A - C_P) - \ln(C_A^0 - C_P^0)] &= \frac{D \times \beta}{l} \times t \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \ln \left(\frac{C_A - C_P}{C_A^0 - C_P^0} \right) &= \frac{D \times \beta}{l} t \end{aligned}$$

Equação 6

Considerando que:

$$C_A = S_i \times P_A, J_i = \frac{D \times S_i \times (P_A - P_P)}{l} \text{ e } P_i = D \times S_i$$

Onde:

- S_i é o coeficiente de solubilidade do componente i na membrana (cm^3 (STP)/ $\text{cm}^3 \cdot \text{bar}$);
- P_i é o coeficiente de permeabilidade

Substituindo na Equação 7:

$$\Leftrightarrow S_i \times \ln\left(\frac{P_A^0 - P_P^0}{P_A - P_P}\right) = \frac{D \times \beta}{l} t \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{\beta} \times \ln\left(\frac{\Delta P_0}{\Delta P}\right) = \frac{P \times t}{l} \Leftrightarrow$$

$$\frac{1}{\beta} \times \ln\left(\frac{P_{\text{Alimentação}}^0 - P_{\text{Permeado}}^0}{P_{\text{Alimentação}} - P_{\text{Permeado}}}\right) = \frac{P \times t}{l}$$

Equação 7

Onde:

- β é o parâmetro geométrico da célula (m^{-1});
- $(P_{\text{Alimentação}}^* - P_{\text{Permeado}}^*)$ é a diferença de pressão no instante t_0 (bar);
- $(P_{\text{Alimentação}} - P_{\text{Permeado}})$ é a diferença de pressão ao longo do tempo (bar);
- P é a permeabilidade ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$);
- t é o tempo (s);
- l é a espessura da membrana (l).

O β obtém-se através da equação seguinte:

$$\beta = A_{\text{membrana}} \times \left(\frac{1}{V_{\text{alimentação}}} + \frac{1}{V_{\text{permeação}}} \right)$$

Equação 8

Onde:

- A é a área da membrana (m^2);
- $V_{\text{Alimentação}}$ é o volume do compartimento da alimentação (m^3);
- V_{Permeado} é o volume do compartimento do permeado (m^3).

O β foi determinado experimentalmente devido ao facto de não se saber ao certo qual o volume de cada compartimento. Procedendo-se à permeação do N_2 com uma membrana de PDMS a 30°C , cuja permeabilidade é conhecida ($2.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), calculando se o β tendo em conta a Equação 8. A permeabilidade é o declive do gráfico quando se representa $\frac{1}{\beta} \times \ln\left(\frac{P_{\text{Alimentação}}^* - P_{\text{Permeado}}^*}{P_{\text{Alimentação}} - P_{\text{Permeado}}}\right)$ em função de $\frac{t}{l}$. O β obtido foi de 80.8 m^{-1} . Posteriormente a selectividade entre gases ($\alpha_{A/B}$), normalmente, é relacionada com a permeabilidade de dois componentes puros A e B, calculada pela Equação 9.

$$\alpha_{A/B} = \frac{P_A}{P_B}$$

Equação 9

4. Discussão de resultados

4.1. Funcionalização de membranas de hidrogel com resposta magnética

Com o objectivo de preparar membranas de hidrogel com capacidade de responder a campo magnético, a membrana de PVA foi preparada por incorporação de partículas magnéticas, nomeadamente micropartículas de forma lamelar de óxido de grafeno modificado com Fe_3O_4 (GO). A presença de ferro, permiti-lhes a capacidade de responder a campo magnético aplicado. Como tal, espera-se que a combinação do comportamento magnético destas micropartículas e as propriedades dos hidrogeis, nomeadamente a sua elevada elasticidade, permitam a obtenção de materiais poliméricos, com a capacidade de reverter as suas características estruturais, topográficas e consequentemente controlar as suas características de transporte, por ajuste adequado de um campo magnético externo. O primeiro objectivo deste trabalho foi a implementação de procedimentos de funcionalização que permitissem a obtenção de membranas de hidrogel caracterizadas por uma boa dispersão, homogeneização e a orientação das micropartículas de óxidos de grafeno na matriz polimérica. Para a orientação das micropartículas foi necessário ajustar as condições de campo magnético, de modo a que permitissem a orientação das partículas de acordo com a direcção do campo magnético externo aplicado, sem perturbar a dispersão da componente magnética pela matriz polimérica.

De forma a otimizar o processo de dispersão, as soluções de polímero com diferentes concentrações de GOs (0.05%, 0.1% e 0.2%), preparadas na ausência e presença de campo magnético, foram sonicadas em banho de ultra-sons por tempos diferentes (30, 120 e 180 minutos), antes da adição do agente reticulante. Na Tabela 4.1 e Tabela 4.2 podem-se observar imagens microscópicas e macroscópicas das membranas já gelificadas, após as suas soluções terem sido submetidas a diferentes tempos de sonicação.

Tabela 4.1: Membranas preparadas na ausência de campo magnético com diferentes tempos de sonicação. Imagens obtidas por microscópio com ampliação 4x e zoom 362mm.




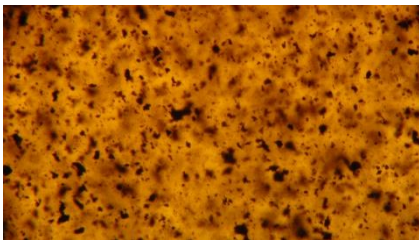


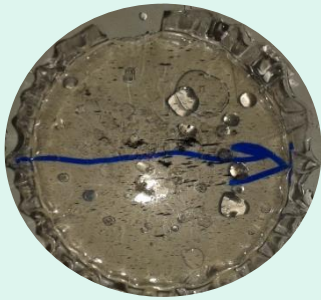
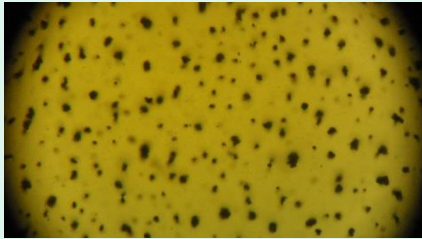
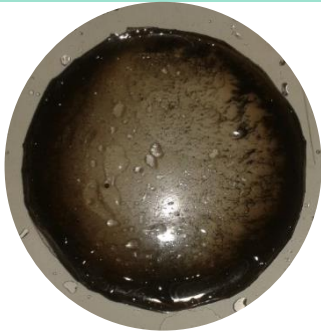
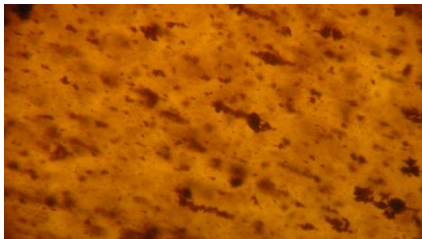


Membranas	Imagens macroscópicas	Imagens microscópicas	Tempo de sonicação (min)
Membranas preparadas na ausência de campo magnético 0.1% GO 2% Glicerol 3% GDA 3% HCl			30
			120
			180

Tabela 4.2: Membranas preparadas na presença de campo magnético com diferentes tempos de sonicação. Imagens obtidas por microscópio com ampliação 4x e zoom 362mm.

Membranas	Fotografias macroscópicas	Fotografias microscópicas	Tempo de sonicação (min)
Membranas preparadas na presença de campo magnético 0.1% GO 2% Glicerol 3% GDA 3% HCl			30
			120
			180

Como se pode verificar na Tabela 4.1 e Tabela 4.2 pode concluir-se que o tempo mínimo de sonicação determinado para que houvesse uma boa dispersão e homogeneização das micropartículas na matriz polimérica foi de 180 minutos, ou seja, a dispersão destas micropartículas melhorou com o aumento do tempo de sonicação, independentemente da concentração de GOs usada.

Como já referenciado no capítulo 3.2.1, foi necessário fazer o ajuste da intensidade de campo magnético, para a orientação das micropartículas de GO na matriz polimérica. Sendo assim, verificou-se que, ao ser aplicada uma intensidade de campo superior a 0.118T à membrana, ocorreria a migração não desejada das micropartículas de GO para a extremidade proximal ao magneto indutor de campo magnético. Por outro lado, ao aplicar-se uma intensidade de campo magnético inferior a 0.014T, não ocorreria o alinhamento orientado de GO nas membranas. Para que houvesse uma dispersão homogênea e orientação destas micropartículas,

foi fundamental seleccionar um valor médio de intensidade de campo magnético, adequado à existência de um equilíbrio entre os dois factores referidos. Esse valor de intensidade de campo médio foi aproximadamente de 0.0235T.

4.2. Caracterização estrutural de membranas de hidrogel

Como já foi referido anteriormente, foram realizados diversos estudos, de forma a analisar a influência da incorporação de GOs e o seu comportamento magnético na estrutura e topografia das membranas, através de microscopia óptica e electrónica de varrimento (SEM), estudos de inchamento e estudos de degradação.

4.2.1. Análise morfológica de membranas de hidrogel através de microscopia óptica e electrónica de varrimento (SEM)

De forma a verificar a incorporação das micropartículas de grafeno na matriz polimérica, realizou-se estudos, com o objectivo de verificar a existência de orientação, agregação e distribuição de GOs na matriz polimérica, através de microscopia óptica, como se pode observar na Figura 4.1.

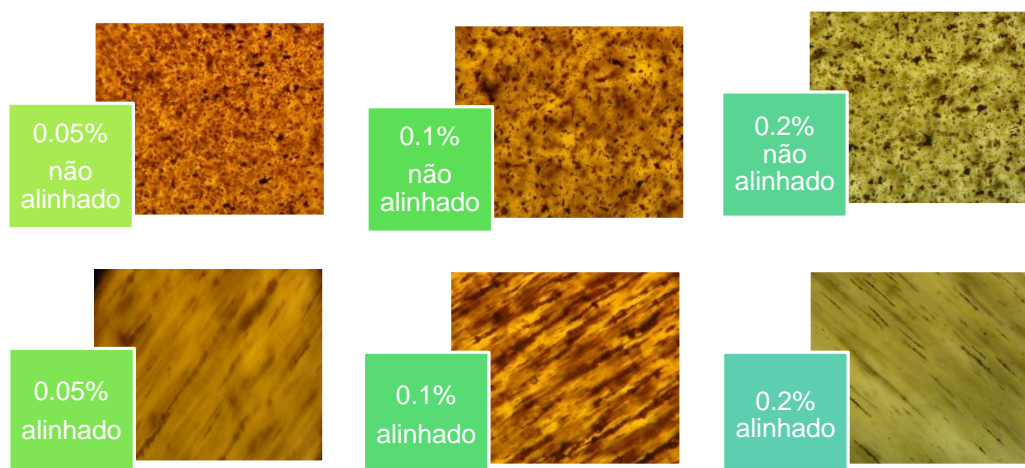


Figura 4.1: Imagens microscópicas das membranas com diferentes percentagens GO, preparadas na ausência e presença de campo magnético. Imagens obtidas por microscópio com ampliação 4x e zoom 362mm.

Após análise microscópica, e ter-se observado micropartículas de GO e o seu alinhamento na matriz, procedeu-se posteriormente, à análise morfológica do corte transversal das membranas de PVA com duas percentagens de GO (0% e 0.2%), através de SEM. Estas imagens permitiram demonstrar a capacidade de alinhamento do campo magnético, a ausência

ou presença de poros, a afinidade dos GOs à matriz e o tamanho de agregados das micropartículas.

As estruturas “lamelares” mais claras presentes nas imagens abaixo correspondem ao grafeno, como se pode observar na Figura 4.2 (2), Figura 4.3 e Figura 4.5.

Na Figura 4.2, a imagem SEM correspondente ao hidrogel de PVA (1), demonstra que esta tem uma estrutura densa, tendo em conta que a membrana não se encontra humidificada, não sendo possível visualizar regiões porosas. As fissuras presentes na imagem de corte transversal são devido ao corte da membrana por azoto líquido. Na imagem correspondente à membrana preparada com 0.2% de GO (Figura 4.2 (2)), é possível visualizar micropartículas de GO na sua estrutura, assinaladas a verde.

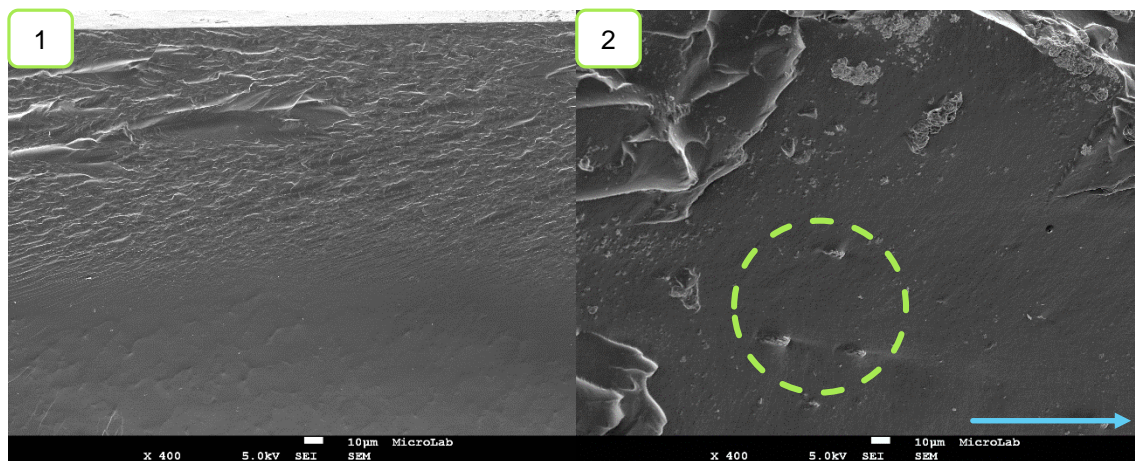


Figura 4.2: Imagens SEM do corte transversal da membrana de PVA (1) e da membrana preparada com 0.2% de GO alinhada (2). A seta azul indica a orientação de campo magnético aplicado.

Observando os resultados de imagens SEM apresentados na

Figura 4.3 (4), pode-se confirmar o efeito do campo magnético nas micropartículas de GO durante o processo de reticulação, pela visualização do alinhamento destas na membrana. Os aglomerados de micropartículas de GO, devido à disposição destas na matriz polimérica, de acordo com a orientação do campo magnético, dão lugar a aglomerados alongados. Pode-se também verificar a evidência de aglomerados de micropartículas na membrana preparada na ausência de campo (Figura 4.3 (3) e Figura 4.5 (5,6,7)).



Figura 4.3: Imagens SEM do corte transversal da membrana preparada com 0.2% de GO, na ausência de campo magnético (3), e sob influência de campo magnético (4).

Com base na análise de SEM foi possível determinar a distribuição de tamanhos dos agregados das micropartículas de GO presentes nas membranas representadas na Figura 4.3, através do *software ImageJ*.

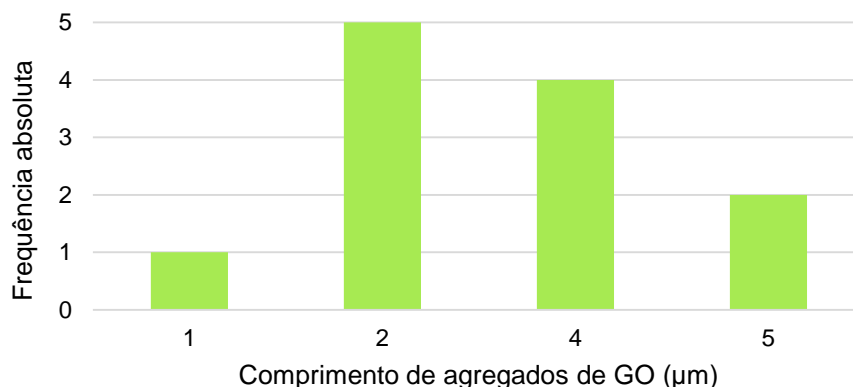


Figura 4.4: Distribuição de tamanhos dos agregados de micropartículas de GO presentes na membrana representada na Figura 4.3 (1).

Como podemos verificar pela Figura 4.4, a distribuição de comprimentos das partículas que compõem os aglomerados presentes na Figura 4.3 (1) foi de $3.2 \pm 1.31 \mu\text{m}$. A presença de poucas micropartículas alinhadas na Figura 4.3 (2), só permitiu fazer três medições de comprimentos, sendo a sua distribuição igual a $2.5 \pm 0.8 \mu\text{m}$.

Verificou-se que as micropartículas de GO não originam espaços intersticiais na estrutura densa das membranas, revelando assim boa afinidade química entre o material magnético e a matriz polimérica, verificando-se uma boa aderência entre os dois compostos.

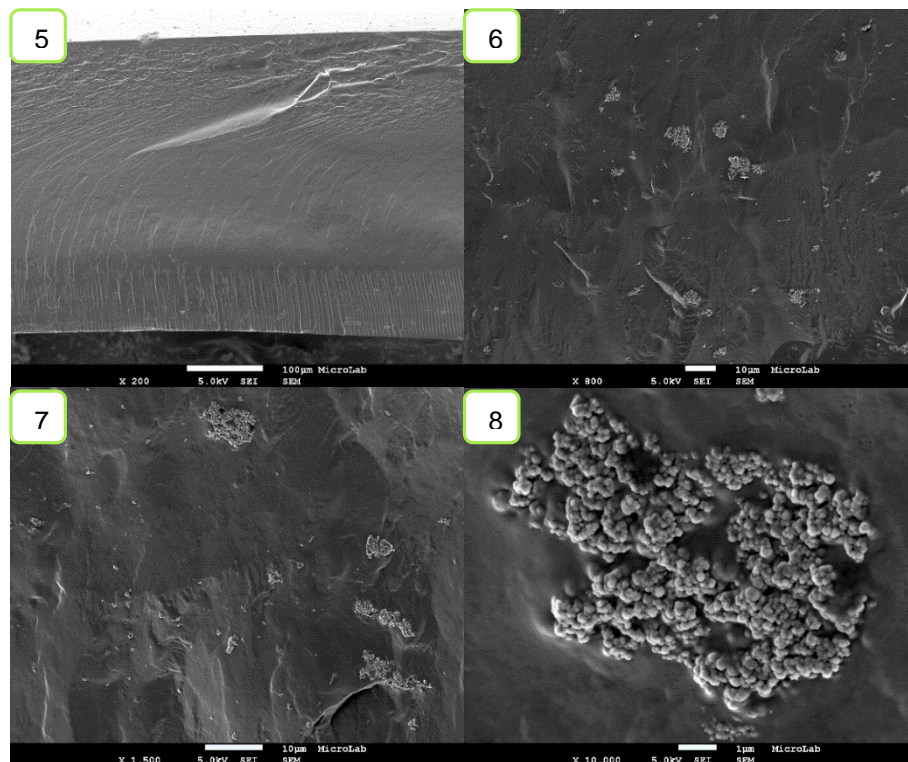


Figura 4.5: Imagens SEM do corte transversal (5 – x200) da membrana de álcool polivinílico, e da membrana preparada com 0,2% GO na ausência de campo, com diferentes ampliações (6-x800; 7-x1500 e 8-x10000).

4.3. Avaliação da estabilidade estrutural e química das membranas de hidrogel

Com o objectivo de avaliar a estabilidade estrutural e química das membranas magnéticas em meio aquoso, membranas de PVA com diferentes concentrações de GO (0.05%, 0.1% e 0.2%) e agente reticulante (GDA, 3 e 6%) foram imersas numa solução de água destilada, por um período de 35 horas. O volume de sobrenadante foi totalmente renovado ao fim de cada 24h. A avaliação da estabilidade estrutural e química da membrana foi avaliada através da análise de espectros de UV-Visível do sobrenadante ao longo do tempo de duração do ensaio.

A Figura 4.6 e Figura 4.7 mostram os resultados das absorvâncias obtidos ao longo do tempo para a fase aquosa, onde foram imersas as membranas contendo 0.1% de GO com as diferentes percentagens de GDA (3 e 6%), reticuladas na ausência de campo magnético. Nas restantes membranas analisadas, observou-se um comportamento análogo.

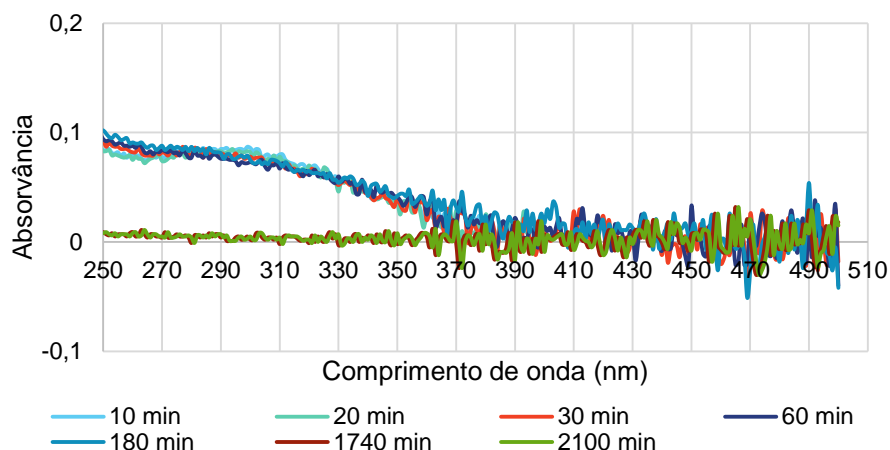


Figura 4.6: Espectro de absorvâncias do volume de sobrenadante medido ao longo do tempo de imersão de uma membrana com 0.1% GO e 3% GDA, sem influência de campo magnético.

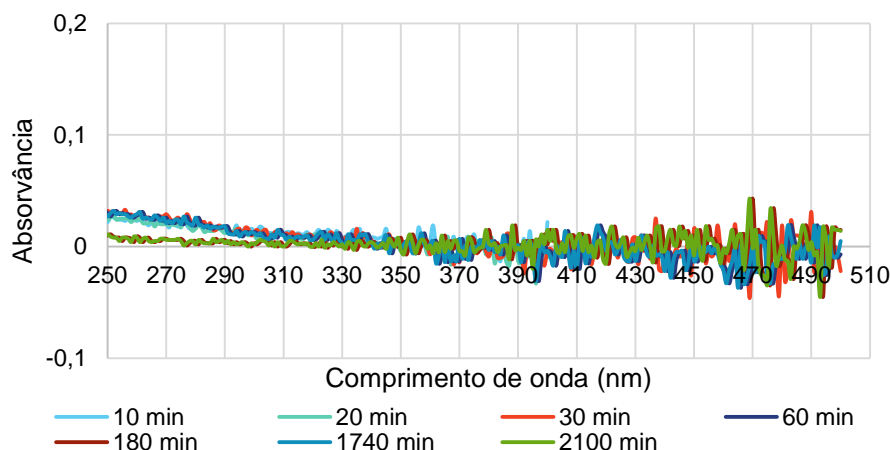


Figura 4.7: Espectro de absorvâncias do volume de sobrenadante medido ao longo do tempo de imersão de uma membrana com 0.1% GO e 6% GDA, sem influência de campo magnético.

A observação destes espectros permitiu detectar a presença de uma banda larga entre os 250 e 370 nm na Figura 4.6 e entre os 250 e 330 nm na Figura 4.7, atribuída à libertação de componentes não ligados ou fracamente ligados à matriz da membrana ao longo do tempo. Também podemos verificar que a libertação destes componentes ocorreu apenas nas primeiras 24 horas (até aos 1740 minutos). Após as primeiras 24h, substituiu-se o sobrenadante, não se verificando qualquer aumento da absorvância (2100 minutos).

A estabilidade estrutural das membranas foi analisada com base na variação de massa de cada uma das membranas na sua condição de inchamento máximo. Para complementar estes resultados, observamos na Figura 4.8, o estudo da variação de percentagem de massa das membranas em estudo, durante o processo de lavagem, acima descrito. Como podemos verificar, a membrana com uma menor concentração de GDA (3%) sofreu um aumento de massa quando imersa em água durante os primeiros 5 minutos, havendo posteriormente um decréscimo ao fim dos primeiros 25 minutos que se manteve até ao final do ensaio (2100 minutos). Esta

variação de massa deverá estar associada à libertação dos componentes não ligados na matriz. Quanto à membrana com maior %GDA (6%), existe um aumento de massa até aos primeiros 30 minutos, menor que o verificado para a membrana com 3% de GDA, havendo posteriormente um decréscimo até aos 180 minutos, mantendo-se constante posteriormente.

Estes resultados vêm a confirmar as bandas de absorvância representadas na Figura 4.6 e Figura 4.7.

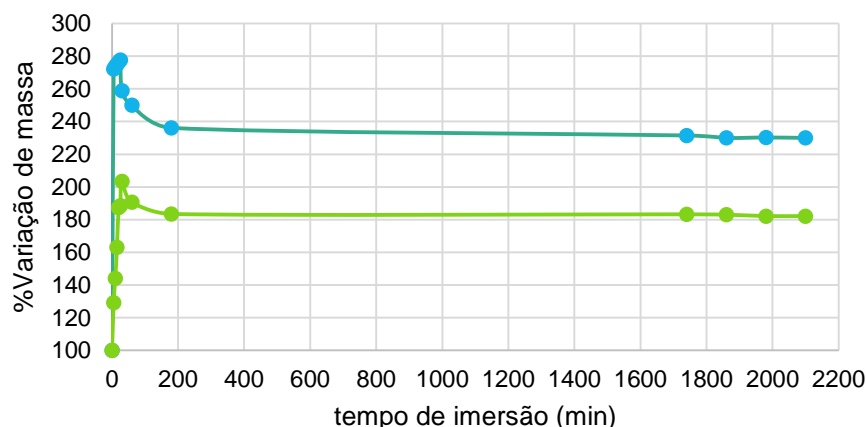


Figura 4.8: Variação de massa da membrana 0.1% GO para membranas preparadas na ausência de campo magnético, com diferentes concentrações de GDA (3% - linha azul e 6% de GDA – linha verde).

Com o aumento da concentração de agente reticulante, a percentagem de inchamento das membranas em estudo, diminui. Isto pode ser explicado atendendo a que a reacção de reticulação elimina os 4 grupos OH do polímero por cada molécula de GDA, que se liga à matriz polimérica, como pode se verificar na Figura 2.3. Assim, o aumento da percentagem de agente reticulante concede à membrana um aumento da estabilidade mecânica, térmica e química, alterando o balanço hidrofílico-hidrofóbico, uma vez que bloqueia os grupos OH, tornando-se mais hidrofóbica [46]. Desta forma, esta tem uma menor capacidade de inchamento devido à presença de menor volume de vazios e consequentemente uma menor capacidade de absorver água.

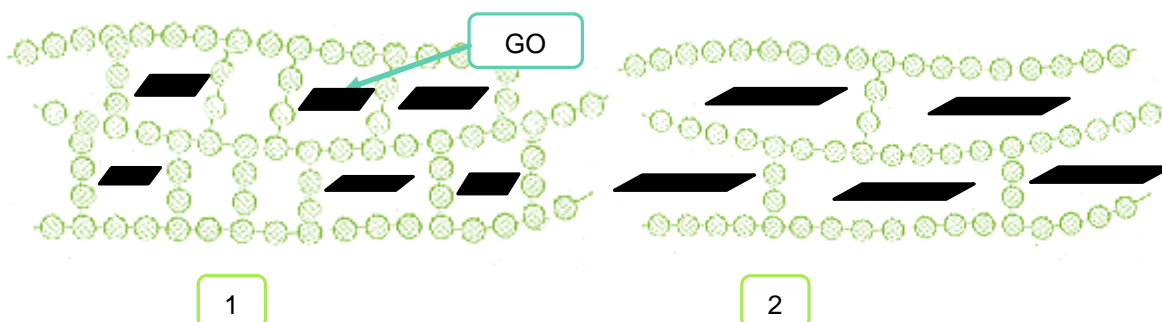


Figura 4.9: Esquema representativo do efeito da concentração de agente reticulante na estrutura polimérica: (1) alta percentagem de agente reticulante e (2) baixa percentagem de agente reticulante.

A percentagem de variação de massa é determinada ao longo do tempo de imersão. Conclui-se que as membranas ficam saturadas de água até aos 25 minutos (membranas com 3% de GDA) e até aos 30 minutos (membranas com 6% de GDA). A partir desse período de tempo, podemos concluir que a perda de massa não estará associada à degradação da matriz de membrana por hidrólise, mas a um processo de lavagem das mesmas, durante o qual se libertam os compostos não ligados, como polímero, glicerol, glutaraldeído, havendo também a possibilidade de haver libertação de algumas micropartículas de óxido de grafeno (ficaram aprisionados na matriz durante o processo de reticulação ou mal ligados à matriz, ligações electrostáticas). Como os resultados mostram, a estrutura da membrana estabiliza após imersão, ao fim de 180 minutos. Após este período de tempo, verificou-se uma perda de massa subtil e lenta para a membrana com 3% de GDA e inexistente para a membrana com 6% de GDA. A obtenção destes resultados foi semelhante para membranas preparadas com menor concentração de GOs (0% e 0.05%), o que mostra que o período necessário para a lavagem da membrana não depende da concentração de GOs presentes na matriz.

4.3.1. Estudo de inchamento de hidrogéis

Sendo o PVA um hidrogel, este tem a capacidade de inchamento por absorção de água. Este estudo teve como objectivo perceber a influência da concentração de GOs na capacidade de inchamento da membrana de PVA. Averiguou-se a influência da variação de concentração de GO (0%, 0.05% e 0.1%), e de GDA (3 e 6%) no inchamento das membranas. Este estudo foi realizado por determinação da variação da massa e de volume das membranas após imersão em água durante 180 minutos.

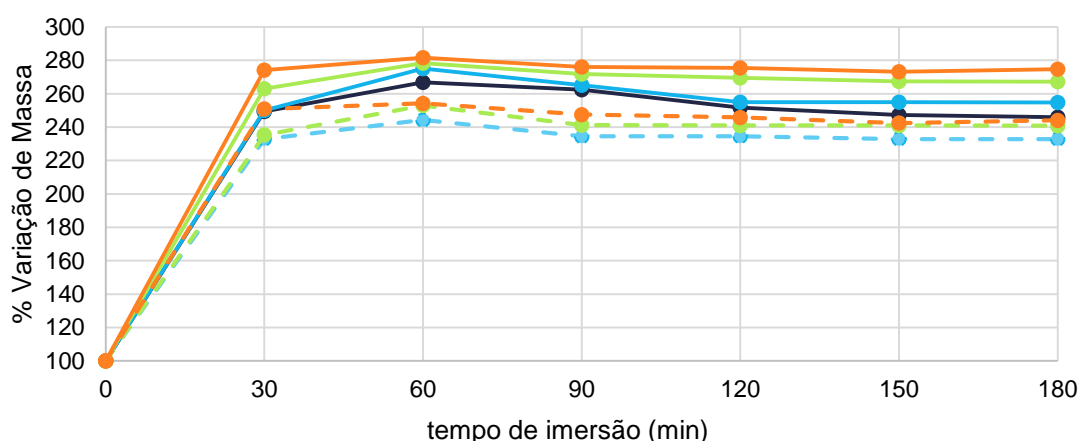


Figura 4.10: Variação de massa das membranas em estudo, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com menor concentração de GDA (3%) ao longo do tempo de imersão, preparadas na ausência (não alinhado – linha a cheio) e na presença (alinhado – linhas a tracejado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).

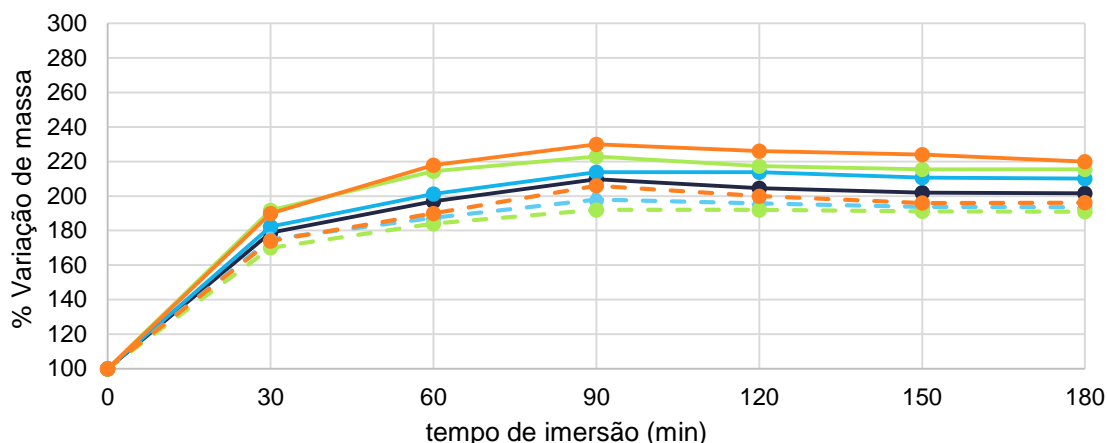


Figura 4.11: Variação da massa das membranas em estudo, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com maior concentração de GDA (6%) ao longo do tempo de imersão, preparadas na ausência (não alinhado – linha a cheio) e na presença (alinhado – linhas a tracejado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).

Como se pode observar na Figura 4.10 e Figura 4.11, as membranas com as diferentes concentrações de GO demonstram ter um perfil idêntico, ou seja, o tempo para se atingir o inchamento máximo nas diferentes membranas, é semelhante. No entanto, o grau de inchamento depende das diferentes concentrações de GO existentes. Quando maior for a concentração de GO na matriz, maior será o grau de inchamento. As membranas com menor concentração de agente reticulante (3%) atingem o seu grau de saturação aos 60 minutos. A partir deste período de tempo, as membranas perdem a capacidade de absorver água e há um equilíbrio da sua massa até ao fim do ensaio. Nas membranas com maior concentração de agente reticulante (6%) atingem o seu grau de saturação aos 90 minutos de ensaio, menor que o verificado para a membrana com 3% de GDA, e posteriormente tendem a equilibrar a sua massa até aos 180 minutos.

As figuras abaixo mostram como a percentagem de variação de massa por inchamento das membranas reflete na percentagem de variação de volume das membranas ao longo do tempo de imersão.

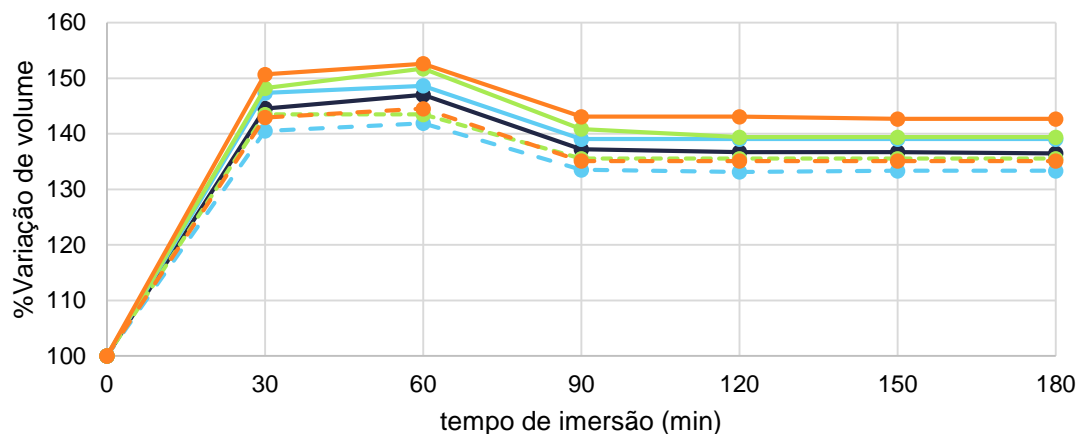


Figura 4.12: Variação de volume das membranas em estudo, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com maior concentração de GDA (3%) ao longo do tempo de imersão, preparadas na ausência (não alinhado – linha a cheio) e na presença (alinhado – linhas a tracejado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).

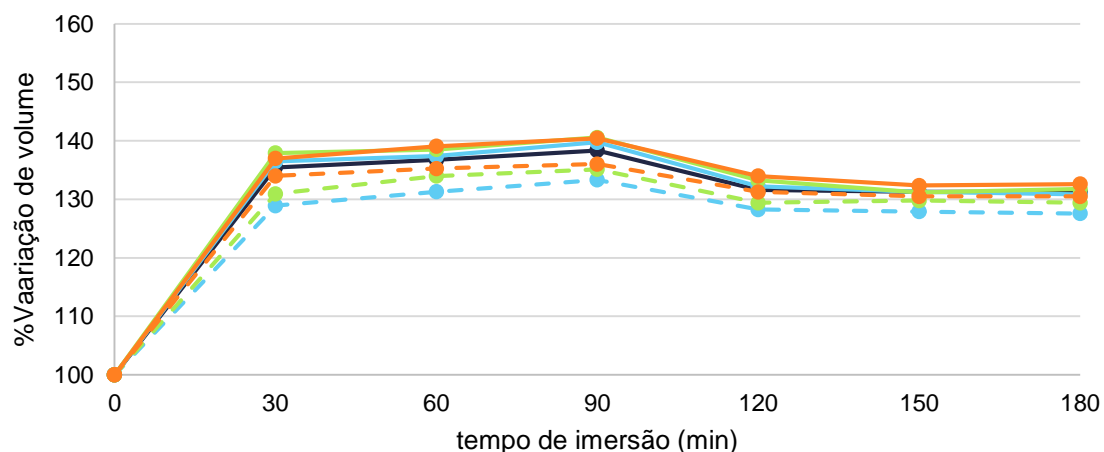


Figura 4.13: Variação de volume das membranas em estudo, com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) com maior concentração de GDA (6%) ao longo do tempo de imersão, preparadas na ausência (não alinhado – linha a cheio) e na presença (alinhado – linhas a tracejado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).

Conclui-se portanto, que o grau de inchamento depende da concentração de GOs, devendo-se ao facto de o óxido de grafeno ser bastante higroscópico [47]. Tanto o grau de inchamento como a variação do volume da membrana ao longo do tempo de ensaio dependem da concentração de agente reticulante existente na membrana, pois estas tendo uma maior percentagem de GDA, apresentam uma menor capacidade de inchamento, devido à presença de menor espaços de vazios e consequentemente, uma menor capacidade de absorver água, comparativamente com as membranas com menor percentagem de agente reticulante.

4.3.2. Estudos de degradação de hidrogéis

A degradação é uma medida de estabilidade do suporte/membrana importante para as aplicações biomédicas. Estes materiais necessitam de apresentar uma degradação controlada, pois os tecidos apresentam diferentes taxas de regeneração, ou seja, a taxa de degradação das membranas têm que ser ajustadas ao tecido a reparar [48]. A degradação da matriz polimérica

utilizada para diferentes áreas biomédicas (engenharia de tecido ósseo e regeneração de tecidos) deverá ser relativamente lenta, para que haja resistência mecânica até que a regeneração do tecido esteja praticamente concluída [49][50]. Quando em contacto com um meio fisiológico a degradação pode ocorrer por degradação enzimática ou por degradação por hidrólise [51]. A ocorrência da degradação conduz à deterioração das propriedades mecânicas e redução da massa da membrana em estudo.

Após o processo de lavagem, estudo de inchamento e equilíbrio das membranas, foram efectuados ensaios de degradação. Estes ensaios consistem na imersão das membranas em estudo, durante 28 dias, num recipiente com 20mL de solução de PBS 0.01M a pH igual a 6,9, com razão área da membrana/volume de solução de 0.025 cm²/ml, colocadas a uma temperatura de 37°C (por forma a mimetizar as condições em que o fluido fisiológico se encontra no corpo humano) e agitação a 500 rpm.

As Figura 4.14 e Figura 4.16 mostram a variação de massa ocorrida durante o tempo de imersão, com as diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) e de GDA (3% e 6%). Com os ensaios de degradação, foi efectuado em simultâneo, a análise do sobrenadante através de espectroscopia UV-Vis.

As Figura 4.15 e Figura 4.17 mostram uma ampliação da região demarcada a tracejado nas figuras Figura 4.14 e Figura 4.16, respectivamente. Esta ampliação mostra a variação de massa de cada membrana, obtida nos primeiros 100 minutos de ensaio, correspondendo ao período de adsorção de água inicial (inchamento).

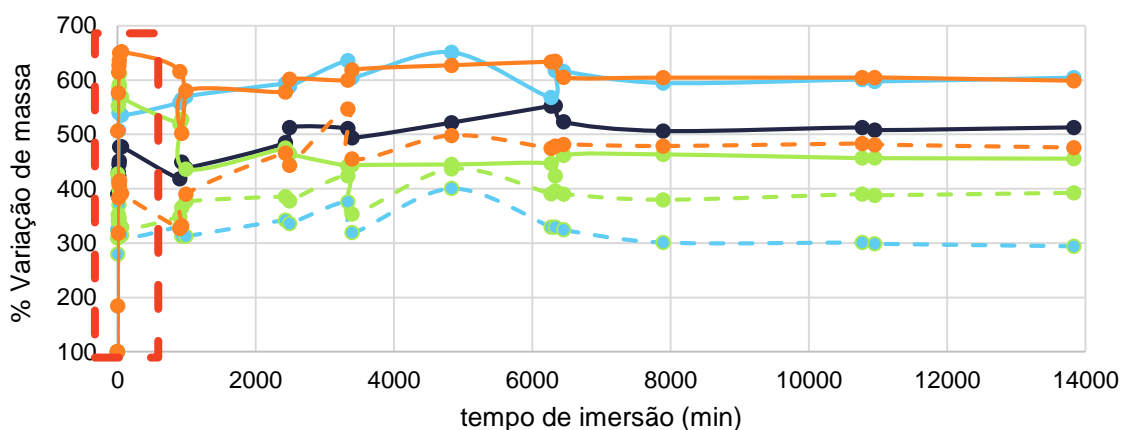


Figura 4.14: Variação da massa das membranas de álcool polivinílico (PVA) com diferentes concentrações de óxido de grafeno (GO) e 3% de agente reticulante, GDA, preparadas na ausência (não alinhado) e na presença (alinhado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).

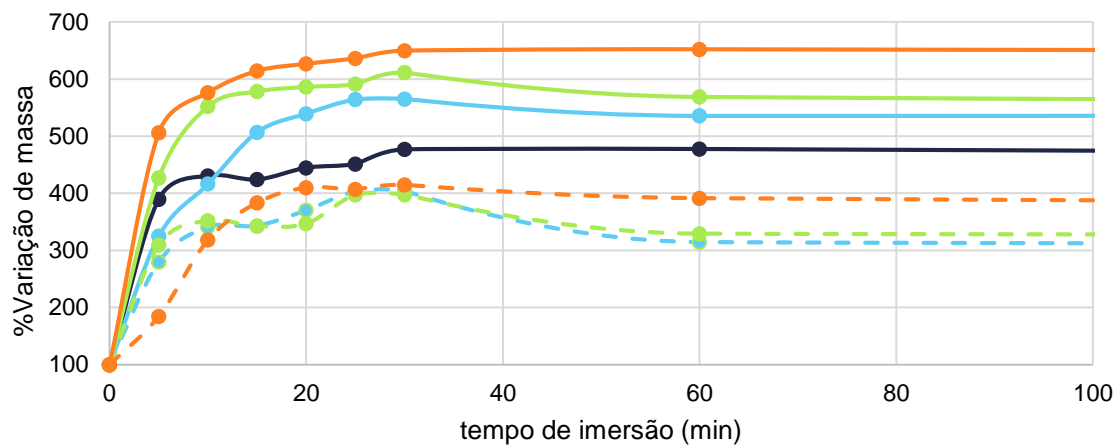


Figura 4.15: Zoom da Figura 4.12, assinalado a vermelho. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).

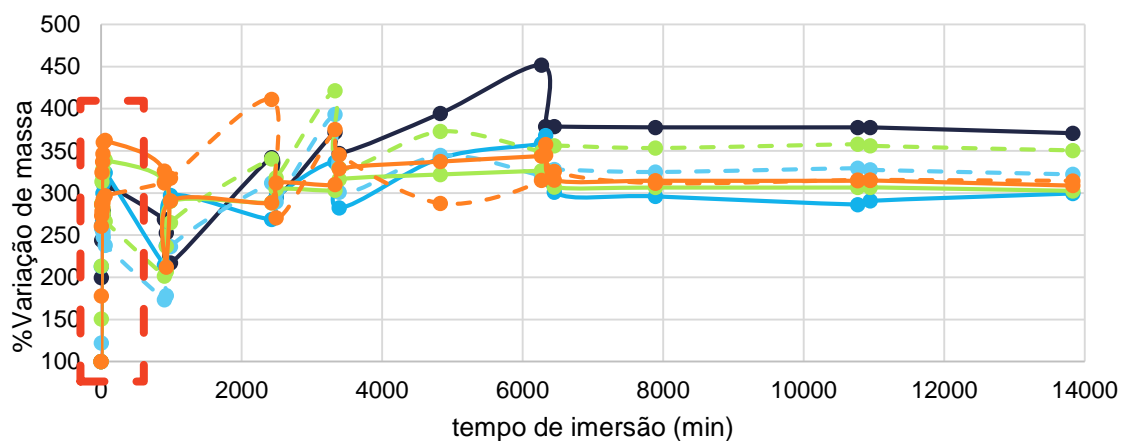


Figura 4.16: Variação da massa das membranas de álcool polivinílico (PVA) com diferentes concentrações de óxido de grafeno (GO) e 6% de agente reticulante, GDA, preparadas na ausência (não alinhado) e na presença (alinhado) de campo magnético. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).

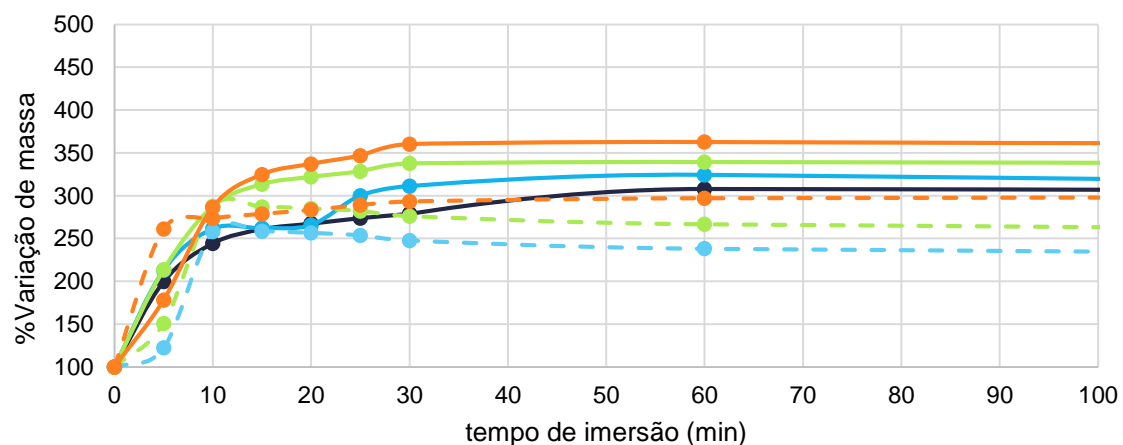


Figura 4.17: Zoom da Figura 4.14, assinalado a vermelho. (Legenda: PVA – azul-escuro; 0.05%GO – azul-claro; 0.1%GO – verde; 0.2% GO – laranja).

Como se pode verificar pelos gráficos Figura 4.15 e Figura 4.17, as membranas com maior percentagem de GO, são as membranas que absorvem mais quantidade de água, devido à elevada higroscopia deste. As membranas com maior %GDA, absorvem água até aos primeiros 60 minutos de ensaio, e as com menor %GDA, até aos 30 minutos. Após estes períodos de tempo e até ao final do ensaio, ocorreram algumas oscilações na variação da massa, podendo dever-se ao procedimento de limpeza e remoção do excesso de água na superfície da membrana, devido às inúmeras medições da massa das mesmas. A partir dos 7000 minutos, verificou-se uma perda não muito significativa de massa em algumas membranas, nomeadamente nas membranas de 0.1% de GO com 3% GDA alinhada, 0.1% e 0.2% de GO com 6% GDA não alinhadas, e que indicasse a existência de degradação das membranas, atingindo o equilíbrio.

Para o auxílio de compreensão dos resultados obtidos, foram efectuadas análises do sobrenadante, por espectroscopia UV-Vis. Como se observa na Figura 4.18 e Figura 4.19, não existe sinal de degradação das membranas de 0.05% de GO não alinhadas com menor e maior %GDA (3 e 6%), embora haja uma banda de baixa intensidade entre dos 250 e 300nm, na Figura 4.18 e a inexistência da mesma na Figura 4.19, que evidencia a libertação de componentes não reticulados.

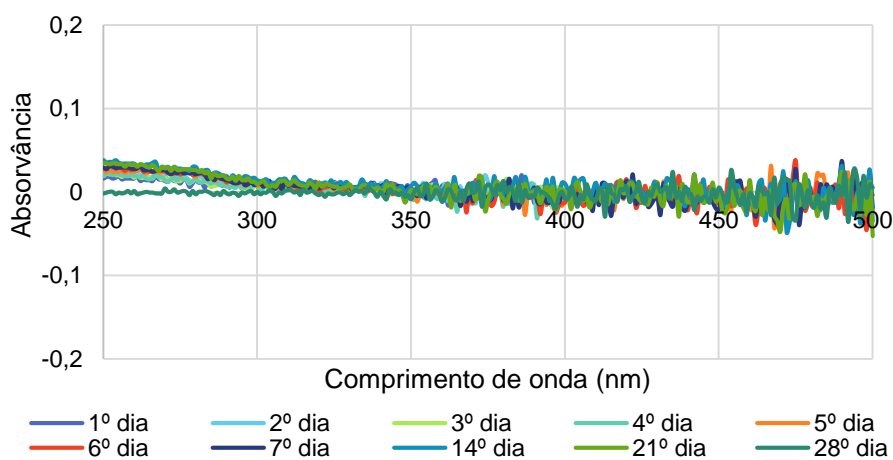


Figura 4.18: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.05% GO, não orientada e 3% de agente reticulante (GDA).

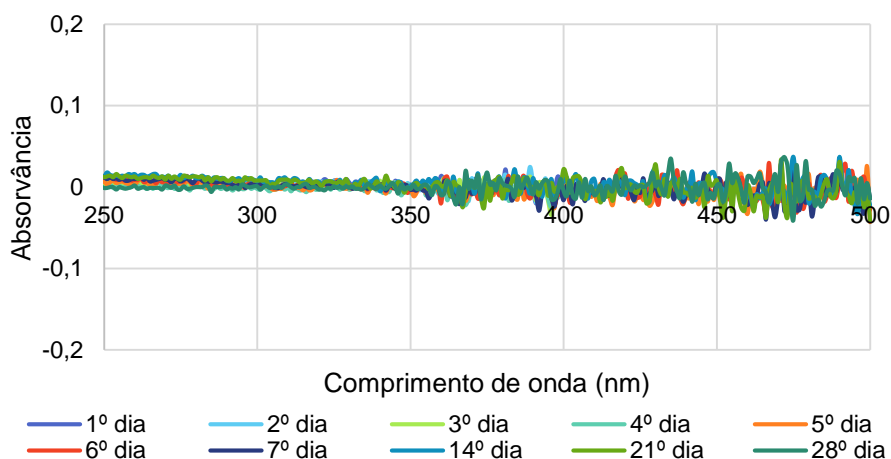


Figura 4.19: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.05% GO, não orientada e 6% de agente reticulante (GDA).

Resultados semelhantes foram obtidos para membranas com diferentes concentrações de GO e agente reticulante, como se pode ver em Anexo II. Assim, estes estudos permitiram concluir que a membrana de PVA não sofre degradação significativa ao longo de cerca de 1 mês em meio aquoso e que a variação da concentração de GOs e agente reticulante nas gamas estudadas, não afectam o processo de degradação das membranas de PVA, durante o período de tempo em que o estudo foi realizado (28 dias).

4.4. Análise do efeito da presença de óxido de grafenos nas propriedades de superfície das membranas, por determinação dos ângulos de contacto

Com o objectivo de verificar o efeito da presença de GO nas propriedades superficiais das membranas de PVA com micropartículas magnéticas, nomeadamente, a rugosidade e o carácter hidrofílico, foram realizados estudos de ângulos de contacto.

Como as membranas de PVA são extremamente hidrofílicas, a utilização da água como solvente, não permitiu a determinação dos ângulos de contacto destas devido ao facto da gota ser absorvida de forma imediata pela membrana. Assim, para a determinação dos ângulos foi utilizado glicerol $\geq 99\%$ v/v, com tensão superficial de 63.4 mN/m (20°C). Foram determinados ângulos de contacto na presença e ausência de campo magnético externo em superfícies de membranas saturadas com água após imersão durante 60 minutos para as membranas com 3% GDA e 90 minutos para as membranas com 6%GDA, e por fim superfícies com um grau de humidade que resultou no equilíbrio estabelecido entre a membrana e uma atmosfera com humidade e temperatura controlada a 50% e 17°C, respectivamente.

Foram medidos os ângulos de contacto do glicerol em superfícies de membranas de PVA contendo quatro concentrações distintas de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) e concentrações diferentes de agente reticulante (3 e 6%).

Os ângulos de contacto registados para membranas (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% GO) no estado máximo de saturação na ausência de campo magnético externo estão representados na Figura 4.20.

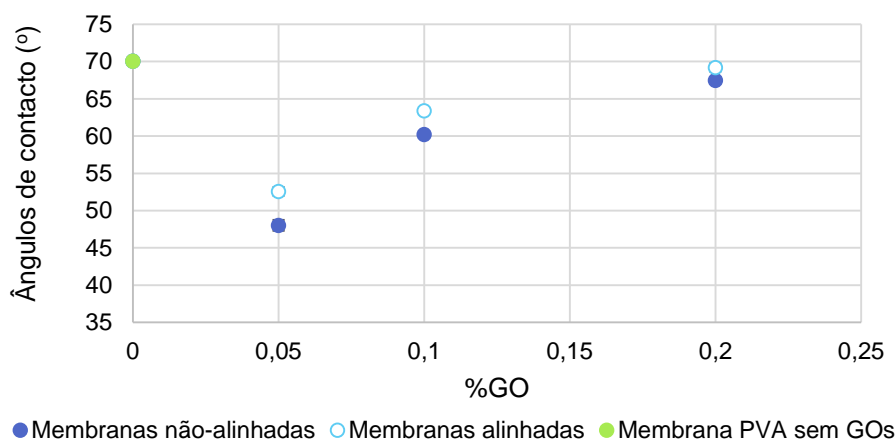


Figura 4.20: Medição de ângulos de contacto da membrana de PVA com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) e concentração constante de GDA (3%), no máximo grau de inchamento na ausência de campo magnético externo.

Pode-se verificar a existência de um decréscimo acentuado nos ângulos de contacto medidos nas membranas com 0.05% de GO, seguindo-se de um aumento progressivo nas membranas de 0.1% e 0.2%, que se aproximam dos ângulos medidos para a membrana de PVA (0%GO).

Este decréscimo acentuado deve-se possivelmente ao facto desta membrana possuir uma maior rugosidade em relação às restantes. A relação entre a rugosidade e molhabilidade foi definida por *Wenzel* [52], que indicou que o aumento da rugosidade melhoraria a molhabilidade causada pela química da superfície, ou seja, se uma superfície é quimicamente hidrofílica, como é o caso das membranas em estudo, esta torna-se mais hidrofílica pelo aumento da rugosidade.

Verificou-se igualmente, que a orientação dos GOs conduz a um aumento muito ligeiro dos ângulos de contacto em relação ao que se obtém quando não existe alinhamento (membranas preparadas na ausência de campo magnético). No entanto, está contido na margem de erro associada à medição de ângulos de contacto, pelo que este aumento é pouco significativo. Verifica-se por microscopia óptica, que houve uma boa distribuição dos grafenos orientados na matriz polimérica, podendo possivelmente diminuir a rugosidade superficial das membranas induzidas pela atracção electrostáticas das mesmas, na direcção do campo externo [53].

Observou-se também que, quanto maior for a concentração de GDA, maior serão os ângulos de contacto, ou seja, a gota de glicerol demonstra ter menos afinidade com a superfície da membrana, indicando que a reticulação diminui o poder hidrofílico [54]. Estes resultados podem ser observados em Anexo III.

Após a medição dos ângulos de contacto nas membranas saturadas, estas foram submetidas a um campo magnético externo com intensidade de 0.0832T durante 2 horas, como se pode observar na Figura 4.21.

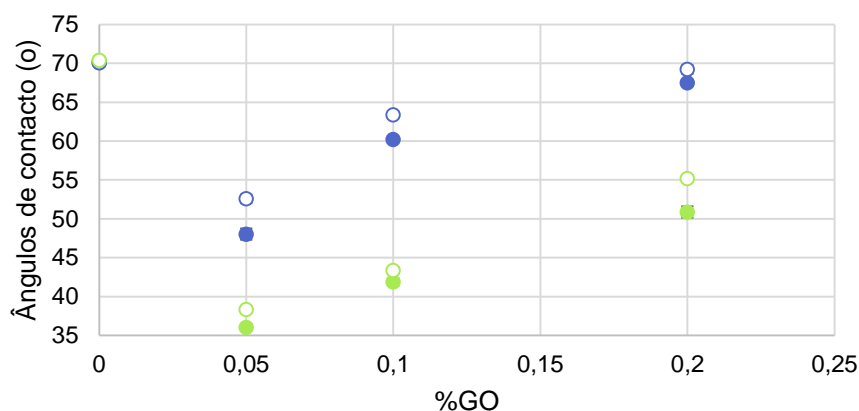


Figura 4.21: Ângulos de contacto do glicerol na superfície de membranas de PVA com 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% de GO e 3%GDA, no máximo grau de inchamento (azul) e presença de campo magnético externo de intensidade 0.0832T (verde), não-alinhadas (círculos a cheio) e alinhadas (círculos vazios).

Observa-se a existência de uma diminuição dos ângulos de contacto durante a aplicação de campo magnético externo, para as membranas alinhadas e não-alinhadas. Isto deve-se à existência de uma atracção exercida nas micropartículas provocada pelo campo magnético externo, alterando, possivelmente, a topografia da membrana.

As membranas após serem submetidas a campo magnético externo, foram equilibradas num exsiccador a 50% de humidade e a uma temperatura de 17°C, durante dois dias. Após equilíbrio destas, foram determinados os ângulos de contacto, como se pode observar pela Figura 4.22.

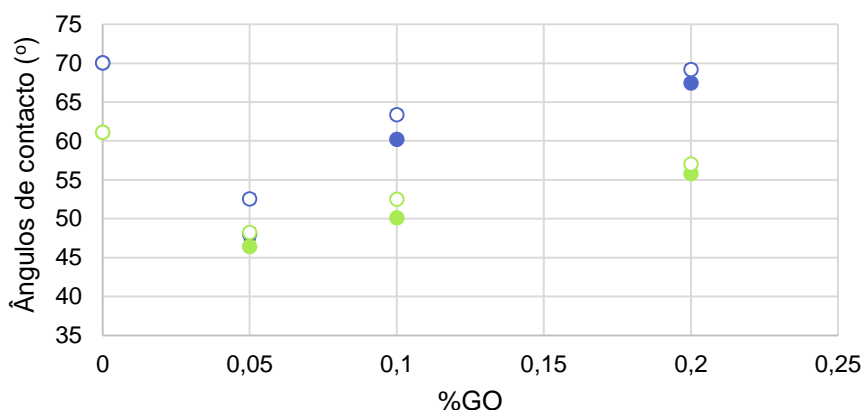


Figura 4.22: Ângulos de contacto do glicerol na superfície de membranas de PVA com 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% de GO e 3%GDA no máximo grau de inchamento (azul) e equilibradas à temperatura e humidade de 50% e $T=17^{\circ}\text{C}$ (verde), não-alinhadas (círculos a cheio) e alinhadas (círculos vazios).

Verificou-se que os ângulos de contacto obtidos para as membranas equilibradas nas condições descritas acima são inferiores aos das membranas no seu estado máximo de inchamento. Os GOs existentes nas membranas, após a aplicação do campo magnético, tendem a recuperar o seu estado inicial (após aplicação do campo magnético externo), aproximando-se dos ângulos de contacto das membranas no grau máximo de inchamento. Isto indica que a atracção sofrida pelas partículas no seio da matriz é um processo magnético reversível. Trata-se também de uma evidência do carácter elástico destas membranas.

A Tabela 4.3 apresenta todos os resultados obtidos nos ensaios de ângulos de contacto.

Tabela 4.3: Ângulos de contacto do glicerol em membranas de PVA e membranas de PVA com diferentes percentagens de GO magneticamente alinhado e não-alinhado e de distintas percentagens de GDA

	%GO	3% de GDA		6% de GDA	
		Membranas não-alinhadas (°)	Membranas alinhadas (°)	Membranas não-alinhadas (°)	Membranas alinhadas (°)
<i>Membranas no máximo grau de inchamento</i>	0	70.08±0.3		78.46±0.5	
	0.05	48.03±0.7	52.57±0.6	53.65±0.4	54.74±0.8
	0.1	60.23±0.05	63.40±0.4	65.19±0.7	68.06±0.6
	0.2	67.49±0.4	69.21±0.6	71.29±0.6	72.6±0.7
<i>Membranas no máximo grau de inchamento submetidas a campo magnético externo (0.0832T)</i>	0	70.37±0.3		78.54±0.5	
	0.05	36.05±0.4	38.36±0.4	39.23±0.8	42.30±0.8
	0.1	41.89±0.5	43.39±0.5	56.73±0.5	59.24±0.2
	0.2	50.87±0.7	55.18±0.5	64.31±0.5	66.62±0.2
<i>Membranas equilibradas a 50% de humidade e $T=17^{\circ}\text{C}$</i>	0	61.13±0.5		71.65±0.3	
	0.05	46.43±0.4	48.25±0.5	48.21±0.6	50.06±0.7
	0.1	50.14±0.3	52.51±0.5	59.18±0.4	63.02±0.7
	0.2	55.81±0.3	57.04±0.4	67.18±0.5	69.24±0.4

4.5. Adsorção de proteínas em membranas magnéticas

A adsorção de proteínas é um processo importante no estudo de materiais, para o uso em engenharia de tecidos, biossensores e processamento de meios biológicos por processos com membranas ou cromatográficos. As interações entre proteínas e superfícies são importantes nestas situações, porque condicionam processos de *fouling* em membranas e/ou regulam a capacidade separativa, quer em processos com membranas, quer em processos cromatográficos, tendo também um papel significativo na adesão celular e biocompatibilidade. Este processo é praticamente imediato, pelo que, quando uma célula se aproxima da superfície do material em estudo, esta interage com a camada de proteína e não com a superfície em si. A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como proteína modelo, devido à sua semelhança com a albumina de soro humano (HSA), pela sua abundância e também por ser comercialmente acessível.

Para a determinação da quantidade de BSA adsorvida por unidade de área, utilizou-se a espectroscopia UV-Vis, na região dos 280 nm.

A recta de calibração para a determinação de proteína foi construída conforme o procedimento descrito no capítulo 3.6. Na Figura 4.23 pode-se observar a recta de calibração obtida, representando-se as absorvâncias medidas em relação à concentração de BSA.

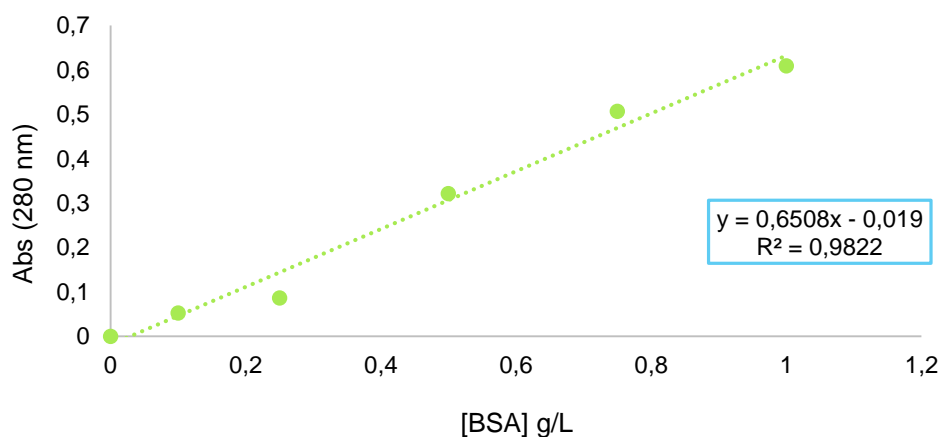


Figura 4.23: Recta de calibração para a determinação da concentração de BSA adsorvida na superfície das membranas em estudo.

Na Figura 4.24 está representado a adsorção de BSA nas membranas de PVA com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05% e 0.2%), alinhadas e não-alinhadas, contendo 3% de GDA.

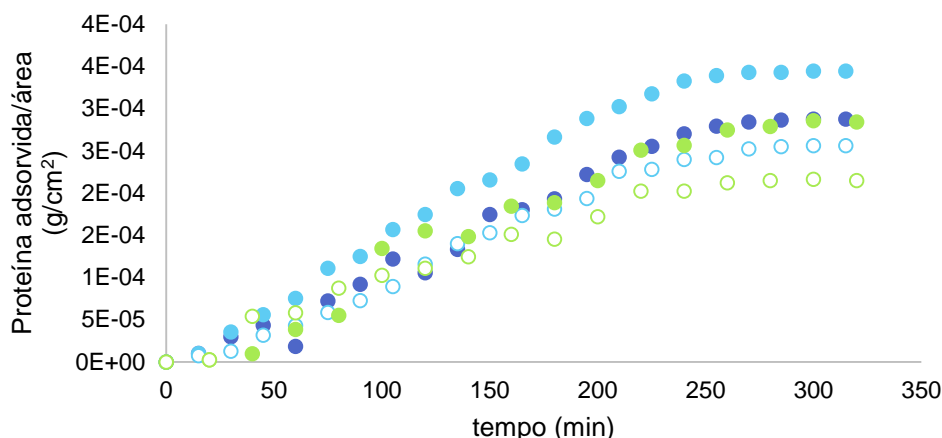


Figura 4.24: Concentração de BSA adsorvida por unidade de área, nas membranas de PVA, alinhadas (círculos vazios) e não-alinhadas (círculos cheios), com diferentes percentagens de GO (0% - azul escuro; 0.05% - azul claro; e 0.2% - verde) com 3%GDA.

Como se pode observar, existe um aumento de adsorção de BSA na membrana com 0.05% de GO, comparativamente com as outras membranas. Também nos ângulos de contacto, apresentados no capítulo anterior, se verificou uma maior resposta magnética das membranas com menor concentração de GOs, o que possivelmente está associado à uma maior rugosidade desta membrana em relação às restantes. O efeito da rugosidade sobre a adsorção de biomoléculas permite controlar a quantidade de material adsorvido. Segundo resultados obtidos por *Rechendorff et al* [55], chegou-se à conclusão que a adsorção de proteínas aumentaria sobre uma superfície rugosa, devido ao aumento da área superficial. Examinando os resultados de adsorção obtidos para a membrana de PVA e PVA com 0.2% de GO, pode-se concluir que as adsorções são semelhantes.

Pode-se observar também a diferença dos processos de adsorções da BSA nas membranas de PVA com 0.05% e 0.2% de GO alinhadas e não-alinhadas. Analisando estes resultados, observa-se uma diminuição de concentração de BSA adsorvida nas membranas alinhadas, comparativamente com as membranas não-alinhadas. Isto deve-se ao facto de as membranas com micropartículas de GO não-alinhadas terem possivelmente uma maior rugosidade, comparativamente com as membranas alinhadas.

Estudos de adsorção idênticos foram realizados na presença de campo magnético, submetendo as membranas a diferentes intensidades de campo: 0T, 0.0832T e 1.198T. Na Figura 4.25, está representado as diferentes concentrações de proteínas adsorvidas com as diferentes intensidades de campo para a membrana de PVA com 0.2% de GO.

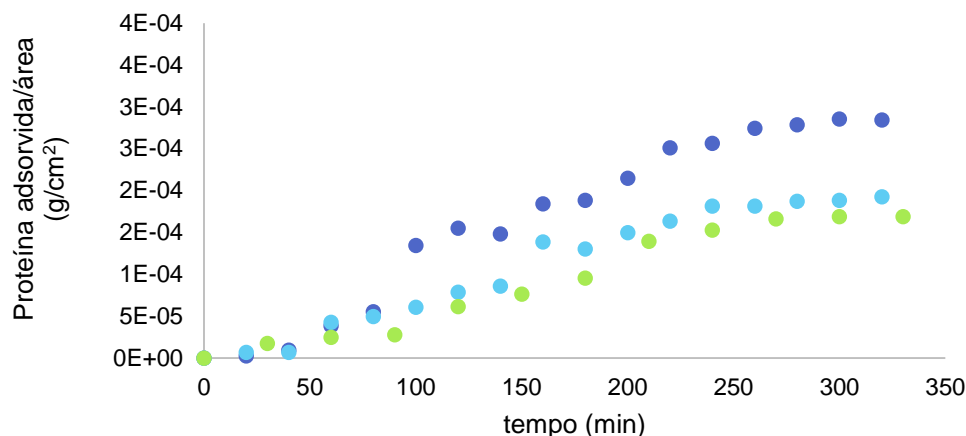


Figura 4.25: Concentração de BSA adsorvida por unidade de área na membrana de PVA com 0.2% de GO não-alinhada, com diferentes intensidades de campo: 0T (azul escuro), 0.0832T (azul claro) e 1.198T (verde).

Ao analisar os resultados obtidos, concluiu-se que há um decréscimo de adsorção de BSA com o aumento da intensidade de campo. Isto incute que poderá existir uma alteração topográfica da superfície das membranas, devido à influência de campo magnético exercido nestas, provocando a inibição da adsorção da proteína, sendo que a membrana que adsorveu uma maior concentração de BSA tenha sido a que não sofreu exposição a campo magnético externo.

4.6. Impacto da presença de óxido de grafenos (GOs) e do seu comportamento magnético no transporte de gases através das membranas de hidrogel funcionalizadas

Um dos requisitos essenciais de um suporte para tecidos celulares é permitir trocas gasosas adequadas entre as células e o meio exterior. Assim, deve permitir o acesso do tecido celular que se desenvolve à sua superfície e/ou no interior da sua matriz a um teor de oxigénio adequado e simultaneamente permitir a remoção do CO₂ resultante da respiração destas células. Tendo em vista a potencial utilização destas membranas como suportes de tecidos celulares, torna-se importante perceber de que forma é que a orientação de GOs pelo campo magnético influencia a permeabilidade e a selectividade das membranas funcionalizadas de PVA aos gases de interesse, neste caso, o O₂ e o CO₂. Para este efeito, foram realizados estudos de transporte gasoso nos quais foram utilizadas membranas com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05% e 0.1%) e de agente reticulante (6% e 9%).

A permeabilidade é determinada através do declive do gráfico quando se representa $\frac{1}{\beta} \times \ln\left(\frac{P_{Alimentação}^* - P_{Permeado}^*}{P_{Alimentação} - P_{Permeado}}\right)$ em função de $\frac{t}{l}$. O β foi obtido experimentalmente, como referido no capítulo 3.7.

Para a utilização deste modelo, foi necessário assumir diferentes pressupostos aplicados neste estudo, tais como:

- O fluxo que passa através da membrana atinge o estado pseudo-estacionário muito rapidamente;
- O transporte ocorre por um mecanismo de difusão;
- Assume-se que não existe resistência na camada limite da interface da membrana.

Este pressuposto é válido porque a difusão através da membrana é o passo limitante da velocidade na fase gasosa. Tendo em conta que a difusão molecular não tem nenhuma camada limite, o perfil de concentrações do gás na membrana em qualquer instante de tempo pode ser determinado pela segunda lei de *Fick*.

Os ensaios foram efectuados com o O₂ e o CO₂, durante aproximadamente 7 horas cada ensaio, a uma temperatura de 30°C. Inicialmente, efectuaram-se os ensaios com membranas de PVA (0% de GO) e 9% de GDA, à temperatura referida.

Primeiramente, foram realizados estudos com uma elevada quantidade de GDA, comparativamente com os estudos descritos anteriormente, para que a membrana pode-se suportar a diferença de pressão existente nos dois compartimentos (força motriz), sem sofrer qualquer fractura, durante o ensaio. Após 7 horas de ensaio, verificou-se que não houve passagem de gás do compartimento da alimentação para o compartimento do permeado, ou seja, não houve indício de permeação gasosa. Sendo a reticulação uma técnica usada para a estabilização das membranas em estudo, esta influência a selectividade e a permeabilidade destas [26]. O aumento da quantidade de agente reticulante da membrana provoca assim, um aumento das interacções na matriz polimérica, desfavorecendo a mobilidade da cadeia e a redução de espaços vazios para a passagem do gás [56]. Após estes ensaios, foi necessário diminuir a concentração de agente reticulante para 6%, para as membranas com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05% e 0.1%), alinhadas e não-alinhadas.

Ao fim das 7 horas de ensaio, observou-se que as membranas apresentavam uma deformação, como se pode ver na Figura 4.26. Isto deveu-se à exposição da membrana ao gás pressurizado, o que levou à alteração da espessura da membrana, representado por uma curva.



Figura 4.26: Membrana de PVA após ensaio de permeação

Após ter-se verificado a existência desta deformação, os resultados foram analisados graficamente. Para efeito de cálculo da permeabilidade, assumiu-se a espessura final da membrana, após o ensaio de permeação.

Examinando a Figura 4.27, observa-se a existência de uma curva correspondente às primeiras 2 horas de ensaio. Após este período de tempo, verificou-se um crescimento de permeabilidade constante.

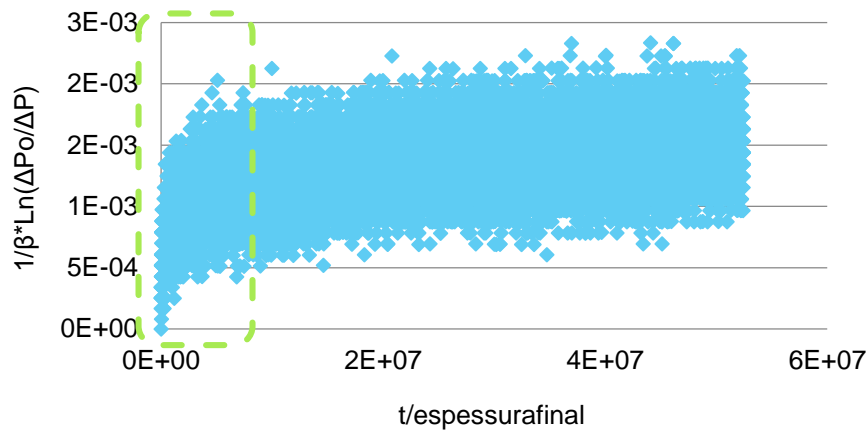


Figura 4.27: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O₂ para a membrana de PVA sem micropartículas magnéticas.

Para análise dos resultados dos ensaios de permeação gasosa das restantes membranas, foram retirados os resultados correspondentes às duas primeiras horas de ensaio, como se pode observar na figura seguinte. Os gráficos de permeabilidade para as membranas com 0.05% e 0.1% de GO, alinhadas e não-alinhadas, estão representadas em Anexo IV.

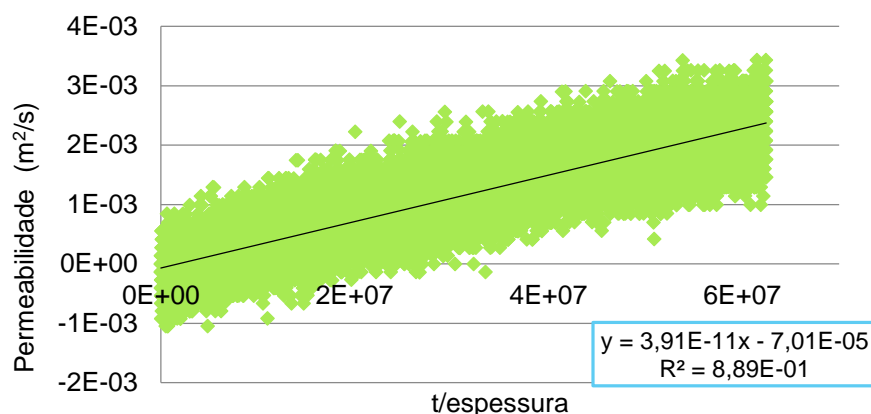


Figura 4.28: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO₂ para a membrana de PVA com 0% de GO.

A Tabela 4.4 mostra os resultados obtidos da permeabilidade e selectividade das membranas estudadas. Estes ensaios apenas foram possíveis devido à estrutura densa e não porosa das membranas.

Tabela 4.4: Resultados de permeabilidade e selectividade da membrana de PVA não funcionalizada e funcionalizada com diferentes concentrações de óxido de grafeno a O₂ e CO₂, a 30°C.

Membranas	Permeabilidade (m²/s)		Selectividade	
	O ₂	CO ₂	O ₂ /CO ₂	CO ₂ /O ₂
0% GO	5.40×10^{-12}	3.91×10^{-11}	0.14	7.24
0.05%GO não-alinhado	1.16×10^{-10}	5.08×10^{-11}	2.28	0.44
0.05%GO alinhado	6.49×10^{-11}	3.47×10^{-11}	1.74	0.58
0.1%GO não-alinhado	2.05×10^{-11}	4.87×10^{-12}	4.21	0.24
0.1%GO alinhado	1.01×10^{-11}	4.55×10^{-12}	2.22	0.45

$$1 \text{ barrer} = 8,3 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} = 10^{-10} \text{ cm}^3 \text{ (STP) cm} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Hg} \cdot \text{s}^{-1}$$

Corroborando os estudos realizados anteriormente por *Hye Min Kim et al*, observou-se que a membrana de PVA é mais permeável ao CO₂ ($3.91 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) do que ao O₂ ($5.40 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$). No entanto, os valores de permeabilidade de CO₂ obtidos para a membrana de PVA não são comparáveis com os valores encontrados na literatura ($1.577 \times 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$) [41], o que poderá estar relacionado com o modo de preparação da membrana testada, em especial, a concentração e o tipo de agente reticulante usado, responsável pela rigidez da membrana e pela dimensão dos espaços intermoleculares.

Para a avaliação da permeabilidade das membranas de PVA com diferentes concentrações de micropartículas magnéticas de GO, teve-se em atenção dois parâmetros de extrema importância, tais como: permeabilidade do PVA e das micropartículas de grafeno aos gases em estudo, e por fim a orientação destas mesmas micropartículas na matriz polimérica.

Os grafenos são micropartículas magnéticas pouco permeáveis a todos os gases [57], sendo de esperar que a permeabilidade das membranas diminuíssem, com o aumento da concentração de GOs.

Na figura seguinte está representado as diferentes permeabilidades obtidas para as diferentes membranas em estudo.

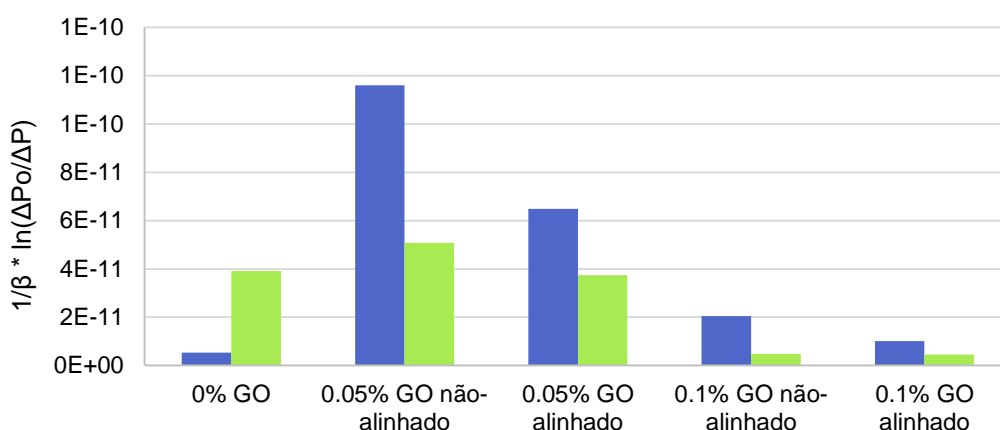


Figura 4.29: Permeabilidade da membrana de PVA com diferentes percentagens de GO (0%, 0.05% e 0.1%), alinhadas e não-alinhadas, ao O₂ (a azul) e CO₂ (a verde), a 30°C.

Através da Figura 4.29, verificou-se que as membranas de PVA com GO apresentam uma maior permeabilidade ao O₂ do que ao CO₂, comparativamente com a membrana de PVA sem GOs. O facto de existir um aumento da permeabilidade na membrana de 0.05% GO comparativamente com a membrana sem GOs poderá ser devido ao facto do grafeno alterar as forças de coesão entre as cadeias poliméricas do PVA, tornando-se mais susceptível a passagem dos gases em estudo [58]. Contudo, isto não explica a inversão da permeabilidade nestes. Neste aspecto, parece ser possível inferir que os GOs possam fazer com que o teor de água na membrana aumente, devido à sua elevada higroscopia. Uma vez a membrana com maior teor de água e sofrendo alterações das forças de coesão das cadeias do polímero por adição de GOs, a permeação dos gases aumenta nas membranas com GOs comparativamente com as membranas sem GOs, mas de uma forma inversamente proporcional aos valores dos gases nestas últimas, devido à diferença de solubilidade destes gases na água. Tendo o CO₂ uma maior solubilidade em água, a temperatura e pressão constante, comparativamente com o O₂ [59] seria de prever a hipótese que este seja mais retido pela membrana com água, e consecutivamente, apresentando uma menor permeação comparativamente ao O₂ que apresentará valores de saturação mais baixos e por isso maiores valores de permeação.

Também se pode observar que com o aumento da percentagem de GOs, existe uma diminuição da permeabilidade tanto a O₂ como a CO₂, como era esperado, devido à elevada impermeabilidade dos GOs, como já foi referido atrás. Também seria esperado, que as

membranas não-alinhadas tivessem uma maior permeabilidade do que as membranas alinhadas. Como se pode ver nas imagens microscópicas (Figura 4.1), as micropartículas de GO alinhadas, ocupam mais espaço na membrana, deixando poucos espaços vazios para a passagem de gás nestas.

Para além da permeabilidade, há outro parâmetro de extrema importância a estudar, nomeadamente, a selectividade. Esta foi determinado pela Equação 9 como descrito no capítulo 3.7. Os resultados estão representados na Tabela 4.4.

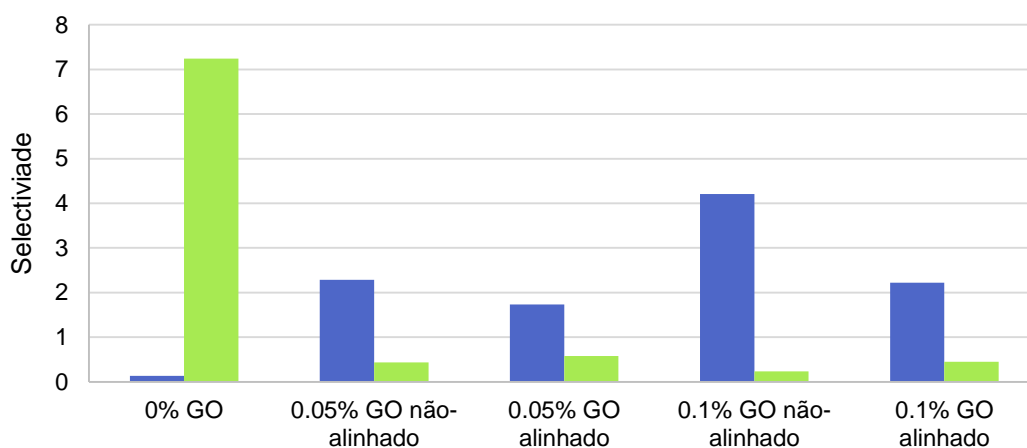


Figura 4.30: Selectividade da membrana de PVA com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05% e 0.1%), preparadas na presença e ausência de campo, ao O₂ (a azul) e ao CO₂ (a verde), a 30°C.

Como se pode observar, a membrana de PVA é extremamente selectiva a CO₂, devido à sua alta permeabilidade a CO₂ e baixa a O₂. Observando a Figura 4.30, verifica-se que as membranas com GOs incorporados, apresentam uma maior selectividade ao O₂ do que ao CO₂, ou seja, embora o transporte gasoso tenha diminuído, as membranas em estudo tornaram-se mais selectivas o O₂, o que pode ser explicado por uma maior afinidade que o GO possa ter com o O₂. Segundo *Habert, Borges e Nobrega* [60], a selectividade aumenta com a redução do espaço disponível entre as cadeias da matriz polimérica, o que pode ser obtido com o aumento das interações inter e intramoleculares, pela presença de grupos polares.

5. Conclusão

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento e caracterização de membranas magnéticas de álcool polivinílico (PVA) com diferentes percentagens de óxido de grafeno (GO), reticuladas com glutaraldeído (GDA), para fins biomédicos.

Para tal, foram desenvolvidas metodologias de preparação e funcionalização destas mesmas membranas. Foram realizados vários estudos que permitiram compreender a influência das micropartículas magnéticas nas suas características estruturais, morfológicas e físico-químicas, através de análises de microscopia óptica e microscopia electrónica de varrimento (SEM), estudos de inchamento e degradação, análise da superfície da membrana por determinação de ângulos de contacto usando glicerol como solvente, adsorção de proteínas e por fim, estudos de transporte gasoso em membranas de hidrogel magnéticas.

O primeiro objectivo deste trabalho foi a implementação de procedimentos de funcionalização que permitissem a obtenção de membranas de hidrogel caracterizadas por uma boa dispersão, homogeneização e orientação das micropartículas de GO na matriz polimérica. Para estes dois processos, as soluções de polímero com as diferentes concentrações de GO tiveram de ser sonicadas num banho de ultra-sons, antes de ser inserido o agente reticulante, posteriormente a este procedimento, serem submetidas a uma determinada intensidade de campo magnética. Concluiu-se que se conseguiria obter uma boa dispersão e homogeneização das micropartículas magnéticas na matriz polimérica, ao fim de 180 minutos de sonicação e que o valor de intensidade de campo ideal para que ocorresse uma boa orientação das micropartículas de GO seria de 0.0235T.

De forma a confirmar a presença, a incorporação, a orientação das micropartículas de GO nas matrizes poliméricas e a sua influência na morfologia destas, foram efectuados estudos de microscopia electrónica de varrimento SEM e microscopia óptica. Através da observação de imagens SEM, concluiu-se que as membranas são densas. Evidenciou-se também, a presença de aglomerados de micropartículas nas membranas não-alinhadas, apresentando uma boa dispersão. Já nas membranas alinhadas, verificou-se uma boa orientação das micropartículas em direcção ao campo externo.

Após estas micropartículas estarem bem dispersas na matriz, foi estudada a estabilidade química e estrutural das membranas de PVA com diferentes concentrações de GO por imersão em solução aquosa. Através dos ensaios de lavagem, verificou-se que a lavagem não depende da concentração de micropartículas de óxido de grafeno nem de agente reticulante; a perda de massa não está associada a uma degradação da membrana mas sim a uma libertação de material não ligado.

Após o processo de lavagem, realizaram-se estudos de inchamento, nos quais se verificou que, o grau de inchamento depende das concentrações de GOs e de agente reticulante. Posteriormente, efectuaram-se ensaios de degradação. Assim, estes estudos permitiram concluir que as membranas não sofrem degradação ao longo de cerca de 1 mês em meio aquoso e que a variação da concentração de GOs e agente reticulante nas gamas estudadas, não afectam o processo de degradação das membranas de PVA, durante o período de tempo em que o estudo foi realizado (28 dias).

Com o objectivo de verificar o efeito da presença de GO nas propriedades superficiais das membranas de PVA com micropartículas magnéticas, foram realizados estudos de ângulos de contacto, em três ensaios diferentes: as membranas no seu máximo de inchamento, submetidas ao campo magnético externo perpendicular à superfície destas, e por fim com as membranas equilibradas a uma humidade e temperatura controlada. Foram testadas membranas com quatro concentrações distintas de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) e duas concentrações de agente reticulante (3% e 6%). Pode-se então concluir que ao serem incorporados micropartículas de óxido de grafeno nas membranas, estas tornam-se mais hidrofílicas. Verificou-se também um decréscimo acentuado nos ângulos das membranas com 0.05% de GO, por possível aumento da rugosidade; membranas alinhadas apresentam ângulos de contacto maiores e por incorporação de GOs, poderá ter ocorrido alteração da topografia das membranas, quando expostas ao campo magnético externo e humidade e temperatura controlada.

De seguida, foram realizados ensaios de adsorção de proteína, a BSA. As membranas com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05% e 0.2%), foram submetidas a diferentes intensidades de campo (0T, 0.0832T e 1.198T), durante o processo de adsorção. Observou-se a existência de uma maior quantidade de proteína adsorvida por parte da membrana de menor concentração de GO (0.05%) e nas membranas não-alinhadas, devido provavelmente ao facto de esta membrana apresentar uma maior rugosidade, comparativamente com as outras membranas. Concluiu-se também que existe um decréscimo de adsorção de BSA com o aumento da intensidade de campo. Isto incute que poderá existir uma alteração topográfica da superfície das membranas, devido à influência de campo magnético exercido nestas, provocando a inibição da adsorção da proteína.

Por último, pretendeu-se saber qual o impacto da presença de óxido de grafenos (GOs) e o seu comportamento magnético na permeabilidade e selectividade das membranas funcionalizadas de PVA a gases, O_2 e CO_2 . Verificou-se que a membrana de PVA tem uma maior permeabilidade e selectividade ao CO_2 do que ao O_2 . Também se pode observar que com o aumento da percentagem de GOs, existe uma diminuição da permeabilidade aos dois gases em estudo, devido à elevada impermeabilidade dos GOs.

Em suma, as membranas magnéticas de PVA com micropartículas de GO oferecem um grande número de opções para serem usadas potencialmente em aplicações biomédicas enquanto biomaterial, tais como: engenharia de tecidos, nomeadamente scaffolds e biossensores, regeneração óssea, lentes de contacto e libertação controlada de fármacos.

O uso deste hidrogel traz vantagens para as aplicações biomédicas já referidas. Não é tóxico, é não-carcinogénico e é biocompatível. Como pode ser constatado nos resultados obtidos neste trabalho, este hidrogel exibe um elevado grau de inchamento em água ou fluidos biológicos, nomeadamente, solução tampão fosfato (PBS). Devido a estas propriedades, o PVA é capaz de simular o tecido natural, havendo assim, uma fraca probabilidade deste material provocar uma resposta do sistema imunitário do corpo [48].

Estas membranas apresentaram um bom grau de inchamento, nos diferentes ensaios realizados para o efeito. A incorporação de GOs na membrana favoreceu esta característica, devido à elevada higroscopia destas micropartículas. Estas membranas com GOs parecem evidenciar, em função dos resultados obtidos nos diferentes ensaios de inchamento, uma elevada importância para o seu uso em aplicações biomédicas, tais como scaffolds e a libertação controlada de fármacos. Por terem um elevado grau de inchamento, estas membranas irão facilitar a absorção de substâncias, o que favorece o seu uso em scaffolds.

Estes materiais necessitam de apresentar uma degradação controlada, pois os tecidos apresentam diferentes taxas de regeneração, ou seja, a taxa de degradação das membranas têm que ser ajustadas ao tecido a reparar [48]. Nos resultados obtidos, não foi possível verificar degradação nas diferentes membranas, durante o tempo de ensaio. Sendo assim, estas membranas com esta característica poderiam ser usadas para a produção de biossensores.

A incorporação de GOs nas membranas concedeu-lhes uma maior rugosidade, como se pode observar nos resultados obtidos através dos ensaios de ângulos de contacto. Este facto constitui um benefício físico imposto à membrana para adsorção de proteínas, nomeadamente, a BSA, como se pode verificar nos ensaios realizados. Com esta capacidade de adsorção de proteínas, o uso destas membranas poderá aplicar-se na regeneração tecidular.

Através de imagens SEM obtidas, observou-se que estas membranas apresentam uma estrutura densa, beneficiando a passagem controlada de gás nestas, designadamente, O_2 e CO_2 . Este é mais um facto que dá a evidência que estas membranas poderão ser utilizadas para uma regeneração de órgãos e tecidos danificados, facilitando a difusão destes gases que estão envolvidos no processo de metabolismo celular.

Os resultados obtidos neste trabalho parecem comprovar os dados apresentados noutros trabalhos de investigação anteriormente referenciados, designadamente, na

determinação do grau de inchamento e medição de ângulos de contacto, cujos resultados foram semelhantes.

Neste estudo de caracterização de membranas com micropartículas de GO foram igualmente realizados ensaios de permeabilidade e selectividade gasosa, com CO₂ e O₂. Estes ensaios contribuíram para um melhor conhecimento das suas características, designadamente através dos resultados obtidos na permeação da membrana de PVA com as diferentes percentagens de GO. Seria igualmente importante comparar estes dados de permeabilidade e selectividade aos gases referidos, com resultados de trabalhos semelhantes. Contudo, parece não haver evidencia dos mesmos, tendo sido só possível até à presente data, encontrar resultados de permeabilidade correspondente ao CO₂ para membrana de PVA, sem percentagem de GOs.

6. Trabalho futuro

Este trabalho experimental veio demonstrar a aplicabilidade das membranas com características magnéticas na produção de suportes. Contudo, considerando este estudo, um estudo pioneiro, seria importante efectuar-se um maior número de estudos de caracterização, aprofundando o conhecimento de outras propriedades do polímero de forma mais detalhada, tais como:

- Ensaios de microscopia de força atômica, com o objectivo de verificar o impacto da incorporação de GO na rugosidade das membranas, e assim confirmar os resultados obtidos nos ensaios de ângulos de contacto;
- Análises de espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP), com o intuito de saber quais os componentes libertados na membrana no processo de lavagem;
- Realizar ensaios de tracção e perfuração (propriedades mecânicas), com o objectivo de estudar a resistência da membrana por incorporação de GO nestas, pois para o uso de scaffolds, estes necessitam de possuir uma resistência mecânica suficiente para suportar tensões existentes no ambiente de implantação [61].

7. Referências bibliográficas

- [1] J. F. Mano, G. Hungerford, and J. L. Gómez Ribelles, "Bioactive poly(L-lactic acid)-chitosan hybrid scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 8, pp. 1356–1365, Dec. 2008.
- [2] T. Shinoka, C. K. Breuer, R. E. Tanel, G. Zund, T. Miura, P. X. Ma, R. Langer, J. P. Vacanti, and J. E. Mayer, "Tissue engineering heart valves: Valve leaflet replacement study in a lamb model," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 60, pp. S513–S516, Dec. 1995.
- [3] J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, and R. Langer, "Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications.,", *Nano Lett.*, vol. 10, no. 9, pp. 3223–30, Sep. 2010.
- [4] M. P. Paschoalino, G. P. S. Marcone, and W. F. Jardim, "Os nanomateriais e a questão ambiental," *Quim. Nova*, vol. 33, no. 2, pp. 421–430, 2010.
- [5] P. Pereira, "Biocompatibilidade e principais aplicações dos nanotubos de carbono.,", Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- [6] D. Nelson, S. S. Guterres, and O. L. Alves, "*Nanotoxicology: Materials, Methodologies, and Assessments*."Springer; 2014 edition, 2013, p. 400.
- [7] F. Mena, A. Abdelghani, and B. Mena, "Graphene nanomaterials as biocompatible and conductive scaffolds for stem cells: impact for tissue engineering and regenerative medicine.,", *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, Jun. 2014.
- [8] E. de S. C. Junior, "Desenvolvimento de matriz de quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial." Universidade Federal de Minas Gerais.
- [9] Y.-S. Ye, M.-Y. Cheng, X.-L. Xie, J. Rick, Y.-J. Huang, F.-C. Chang, and B.-J. Hwang, "Alkali doped polyvinyl alcohol/graphene electrolyte for direct methanol alkaline fuel cells," *J. Power Sources*, vol. 239, pp. 424–432, Oct. 2013.
- [10] L. Ghasemi-mobarakeh, M. P. Prabhakaran, and M. Morshed, "Application of conductive polymers , scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering," no. January, 2011.
- [11] S. H. Barbanti, C. A. C. Zavaglia, and E. A. R. Duek, "Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos," *Polímeros*, vol. 15, no. 1, pp. 13–21, Mar. 2005.
- [12] D. Duchêne, F. Touchard, and N. A. Peppas, "Pharmaceutical and Medical Aspects of Bioadhesive Systems for Drug Administration," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 14, no. 2–3, pp. 283–318, Jan. 1988.
- [13] P. Gupta, K. Vermani, and S. Garg, "Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery," *Drug Discov. Today*, vol. 7, no. 10, pp. 569–579, May 2002.
- [14] T. V. G. Alves, "Obtenção e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida-co-metilcelulose como sistemas carreadores de cloridrato de propanolol," Universidade Federal do Pará, 2011.
- [15] W. E. Hennink and C. F. van Nostrum, "Novel crosslinking methods to design hydrogels," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 223–236, Dec. 2012.
- [16] K. Deligkaris, T. S. Tadele, W. Olthuis, and A. van den Berg, "Hydrogel-based devices for biomedical applications," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 147, no. 2, pp. 765–774, Jun. 2010.
- [17] N. Peppas, "Hydrogels in pharmaceutical formulations," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, no. 1, pp. 27–46, Jul. 2000.
- [18] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V Dubonos, I. V Grigorieva, and A. A. Firsov, "Electric field effect in atomically thin carbon films.,", *Science*, vol. 306, no. 5696, pp. 666–9, Oct. 2004.
- [19] C. M. Sadahira, "Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis de álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químicos," Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- [20] S. Monnerie, W. Suter, E. L. Thomas, and W. R. J. Young, *Advances in polymer science.* .

- [21] T. A. (ITA) Cruz, T. M. B. (ITA) Campos, and G. P. (ITA) Thim, "Estudo do comportamento do PVA com aditivos inorgânicos," 2008.
- [22] F. R. Cesconeto, "Preparação de Membranas de Quitosana/Poli (vinil álcool) / Poli (β - hidroxibutirato) e Aditivos para Aplicação na Engenharia de Tecidos," Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- [23] T. Wang, M. Turhan, and S. Gunasekaran, "Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel," *Polym. Int.*, vol. 53, no. 7, pp. 911–918, Jul. 2004.
- [24] L. Guerreiro, P. M. Pereira, I. M. Fonseca, R. M. Martin-Aranda, A. M. Ramos, J. M. L. Dias, R. Oliveira, and J. Vital, "PVA embedded hydrotalcite membranes as basic catalysts for biodiesel synthesis by soybean oil methanolysis," *Catal. Today*, vol. 156, no. 3–4, pp. 191–197, Oct. 2010.
- [25] T. U. Eindhoven and R. Magnificus, *Catalytic pervaporation membranes for close integration of reaction and separation door*. 2006.
- [26] H.-K. Yuan, J. Ren, X.-H. Ma, and Z.-L. Xu, "Dehydration of ethyl acetate aqueous solution by pervaporation using PVA/PAN hollow fiber composite membrane," *Desalination*, vol. 280, no. 1–3, pp. 252–258, Oct. 2011.
- [27] K. C. S. Figueiredo, T. L. M. Alves, and C. P. Borges, "Poly(vinyl alcohol) films crosslinked by glutaraldehyde under mild conditions," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 111, no. 6, pp. 3074–3080, Jan. 2009.
- [28] C.-K. Yeom and K.-H. Lee, "Pervaporation separation of water-acetic acid mixtures through poly(vinyl alcohol) membranes crosslinked with glutaraldehyde," *J. Memb. Sci.*, vol. 109, no. 2, pp. 257–265, Jan. 1996.
- [29] H. S. Mansur, C. M. Sadahira, A. N. Souza, and A. A. P. Mansur, "FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 4, pp. 539–548, May 2008.
- [30] C. Ribeiro, "Acetalização de glicerol e fenilacetaldéido assistida por pervaporação em reator de membrana catalítica," Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [31] L. M. Guerrini, M. C. Branciforti, R. E. S. Bretas, and M. P. de Oliveira, "Eletrificação do poli (álcool vinílico) via solução aquosa," *Polímeros*, vol. 16, no. 4, pp. 286–293, Dec. 2006.
- [32] Y. Ikada, "Challenges in tissue engineering.," *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, no. 10, pp. 589–601, Oct. 2006.
- [33] D. W. Huttmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529–2543, Dec. 2000.
- [34] S. H. Barbanti, C. A. C. Zavaglia, and E. A. R. Duek, "Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos," vol. 15, pp. 13–21, 2005.
- [35] "Espectroscopia Electrónica de Varrimento," *Wikipédia*. [Online]. Available: https://pt.wikipedia.org/wiki/Microscópio_eletrônico_de_varredura#Microsc.C3.B3pio_eletr.C3.B4nico_de_varredura_a_baixa_voltagem_.28MEVBV.29. [Accessed: 03-Jul-2014].
- [36] a. Martinez-Ruvalcaba, "Swelling characterization and drug delivery kinetics of polyacrylamide-co-itaconic acid/chitosan hydrogels," *eXPRESS Polym. Lett.*, vol. 3, no. 1, pp. 25–32, Dec. 2008.
- [37] J. S. Jovašević, S. I. Dimitrijević, J. M. Filipović, S. L. Tomić, and M. M. Mičić, "Swelling , Mechanical and Antimicrobial Studies of Ag / P (HEMA / IA) / PVP Semi-IPN Hybrid Hydrogels," vol. 120, no. 2, pp. 279–283, 2011.
- [38] E. S. Costa-Júnior, E. F. Barbosa-Stancioli, A. A. P. Mansur, W. L. Vasconcelos, and H. S. Mansur, "Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, no. 3, pp. 472–481, Apr. 2009.
- [39] P. V. De Arruda, "Glicerol : um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica," no. 3, 2007.
- [40] P. T. V Rosa and A. C. F. Arruda, "Adsorção de proteínas do sangue na superfície de biomateriais," pp. 467–476, 2000.
- [41] M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, Second edi. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996.

- [42] "RCSB Protein Data Bank." [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4F5S>. [Accessed: 15-Aug-2014].
- [43] U. D. S. Paulo and S. H. Libardi, "Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferritina em condições simulando o trato gastrointestinal," Universidade de São Paulo, 2010.
- [44] N. El Kadi, N. Taulier, J. Y. Le Huérou, M. Gindre, W. Urbach, I. Nwigwe, P. C. Kahn, and M. Waks, "Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: ultrasound and structural studies.," *Biophys. J.*, vol. 91, no. 9, pp. 3397–404, Nov. 2006.
- [45] U. D. E. S. A. O. Paulo, E. S. Ferreira, O. Prof, and A. Siuiti, "Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos," Universidade de São Paulo, 2009.
- [46] M. T. A. F. Fernandes, "Membranas Isotrópicas e anisotrópicas densas baseadas em polímeros naturais para desidratação de etanol por pervaporação," Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- [47] S. Zhou and A. Bongiorno, "Origin of the chemical and kinetic stability of graphene oxide.," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 2484, Jan. 2013.
- [48] R. Fontes, "Fabrico e caracterização de scaffolds à base de fosfatos de cálcio Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Mecânica Júri," Universidade Técnica de Lisboa, 2010.
- [49] P. a Gunatillake and R. Adhikari, "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering.," *Eur. Cell. Mater.*, vol. 5, pp. 1–16; discussion 16, May 2003.
- [50] G. F. Muschler, C. Nakamoto, and L. G. Griffith, "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 86-A, no. 7, pp. 1541–58, Jul. 2004.
- [51] C. Portugal, "Membranes in Regenerative Medicine," 2011.
- [52] R. N. Wenzel, "Resistance of solid surfaces to wetting by water," *Ind. Eng. Chem.*, vol. 28, pp. 988–994.
- [53] "Effect of surface roughness on adhesion of graphene membranes Wei Gao and Rui Huang*," pp. 1–13.
- [54] V. S. Praptowidodo, "Influence of swelling on water transport through PVA-based membrane," *J. Mol. Struct.*, vol. 739, no. 1–3, pp. 207–212, Apr. 2005.
- [55] K. Rechendorff, M. B. Hovgaard, M. Foss, V. P. Zhdanov, and F. Besenbacher, "Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness.," *Langmuir*, vol. 22, no. 26, pp. 10885–8, Dec. 2006.
- [56] J. Zhou, M. Ünlü, I. Anestis-Richard, and P. a. Kohl, "Crosslinked, epoxy-based anion conductive membranes for alkaline membrane fuel cells," *J. Memb. Sci.*, vol. 350, no. 1–2, pp. 286–292, Mar. 2010.
- [57] R. R. Nair, H. a Wu, P. N. Jayaram, I. V. Grigorieva, and a K. Geim, "Unimpeded permeation of water through helium-leak-tight graphene-based membranes.," *Science*, vol. 335, no. 6067, pp. 442–4, Jan. 2012.
- [58] M. I. Felisberti, "Estudo da permeabilidade de gases em compósitos de polietileno," Universidade Estadual de Campinas, 1985.
- [59] M. Szikszay, "Geoquímica das águas," *Bol. IG-USP. Série Didática*, no. 5, pp. 1–166.
- [60] A. C. Habert, C. P. Borges, and R. Nobrega, *Processos de separação por membranas*. Rio de Janeiro, 2006, p. 181.
- [61] R. Thomson, M. Yaszemski, J. Powers, and A. Mikos, "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*, 1995.
- [62] W. S. Hummers and R. E. Offeman, "Preparation of Graphitic Oxide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, no. 6, pp. 1339–1339, Mar. 1958.
- [63] R. Cruz, D. A. Pacheco Tanaka, and A. Mendes, "Reduced graphene oxide films as transparent counter-electrodes for dye-sensitized solar cells," *Sol. Energy*, vol. 86, no. 2, pp. 716–724, Feb. 2012.

8. Anexos

Anexo I – Preparação e modificação de óxido de grafeno (GO)

Preparação do óxido de grafeno

A produção de óxido de grafeno foi realizada utilizando o método modificado de Hummer [62][63]. O material de origem foi placas comerciais de grafeno - Grau M5, de Ciências XG - denominados GnPM5.

Modificação de óxido de grafeno

Os grafenos foram modificadas utilizando uma solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ para obter placas de grafeno com Fe_3O_4 ligado. O grafeno, modificado por adição de Fe_3O_4 , obtido foi analisado por Termogravimetria e SEM para avaliar a estrutura do grafeno, a presença e distribuição de Fe_3O_4 por meio de placas. Verificou-se que as partículas de ferro estão ligados a ambas as superfícies das placas de grafeno.

Anexo II – Espectros UV-Vis para as membranas com diferentes concentrações de GO (0%, 0.1% e 0.2%), e de GDA (3e 6%), alinhadas e não-alinhadas.

- Membranas com diferentes percentagens de GO e 3% de GDA:

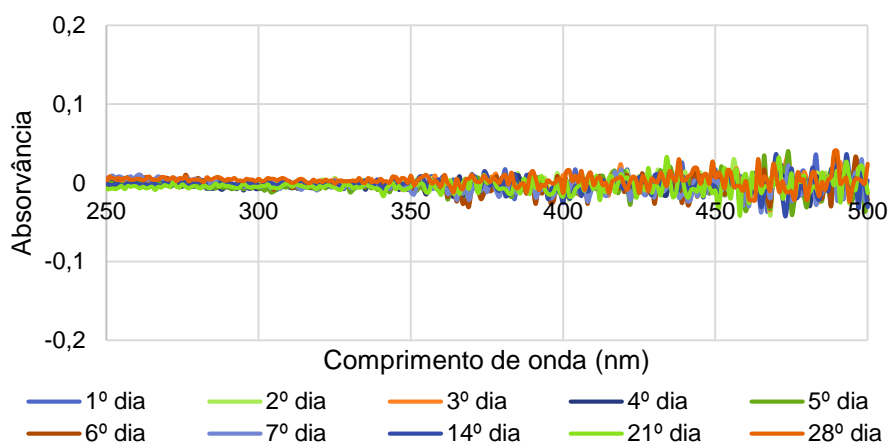


Figura 8.1: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0% de GO e 3% de agente reticulante (GDA).

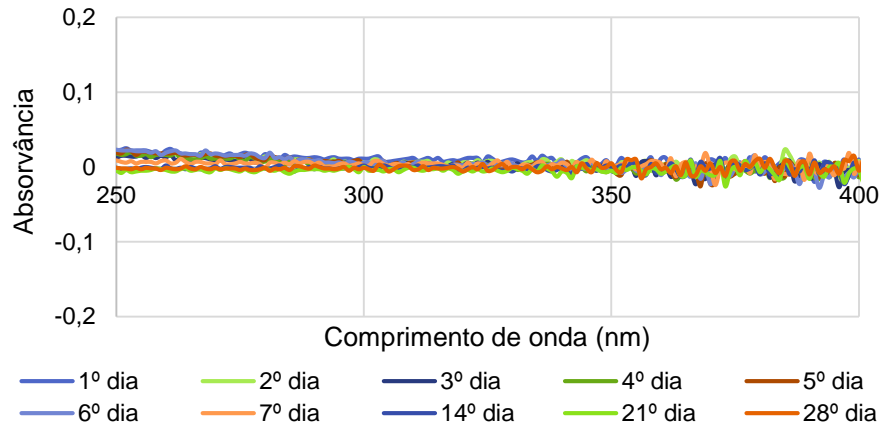


Figura 8.2: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.05% de GO, alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).

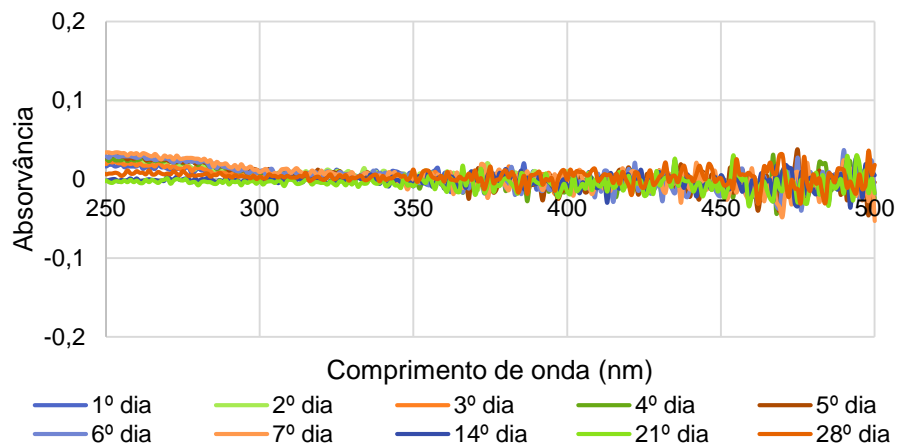


Figura 8.3: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.1% GO, alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).

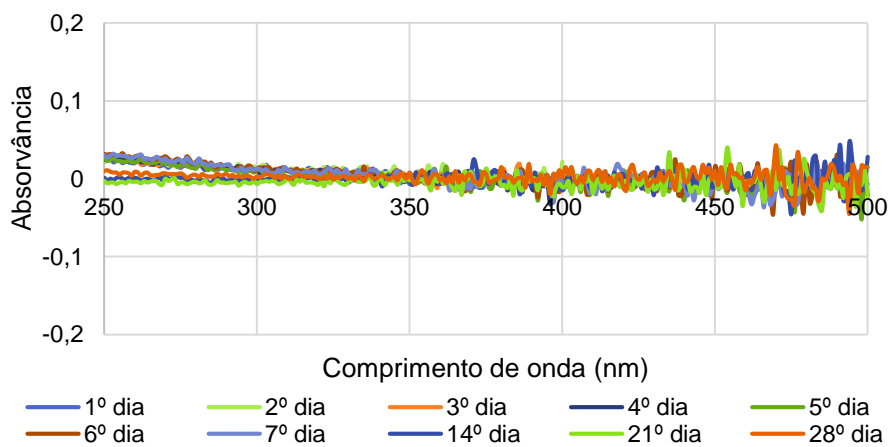


Figura 8.4: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.1% GO, não-alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).

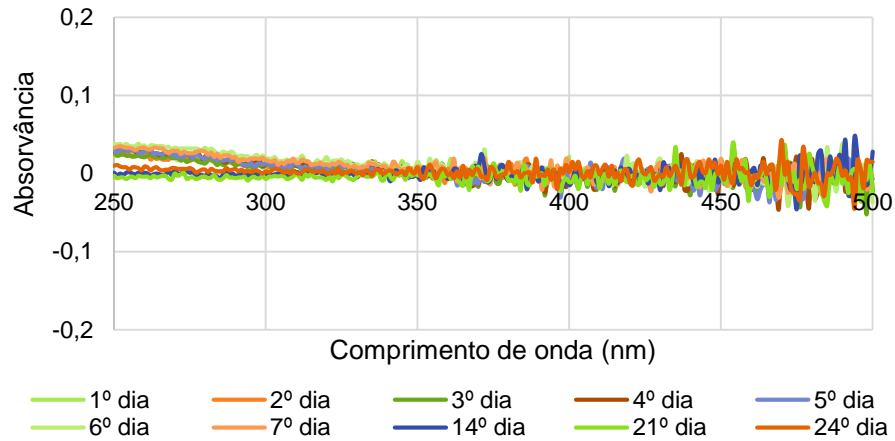


Figura 8.5: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.2% GO, não-alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).

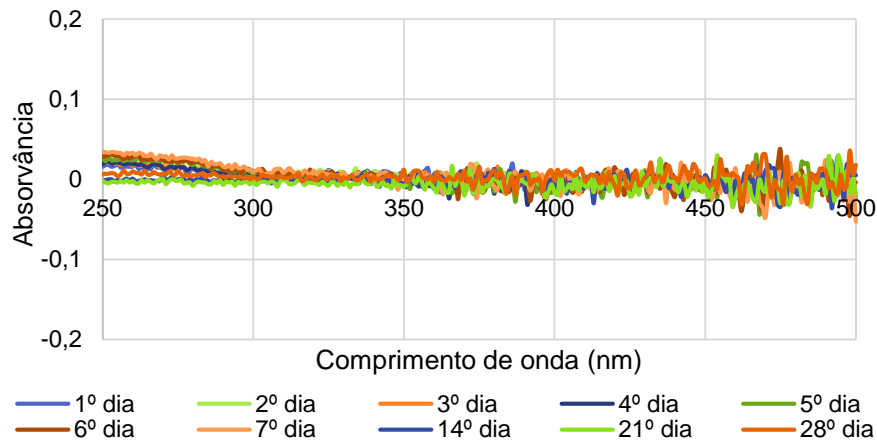


Figura 8.6: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.2% GO, alinhada e 3% de agente reticulante (GDA).

- Membranas com diferentes percentagens de GO e 6% de GDA:

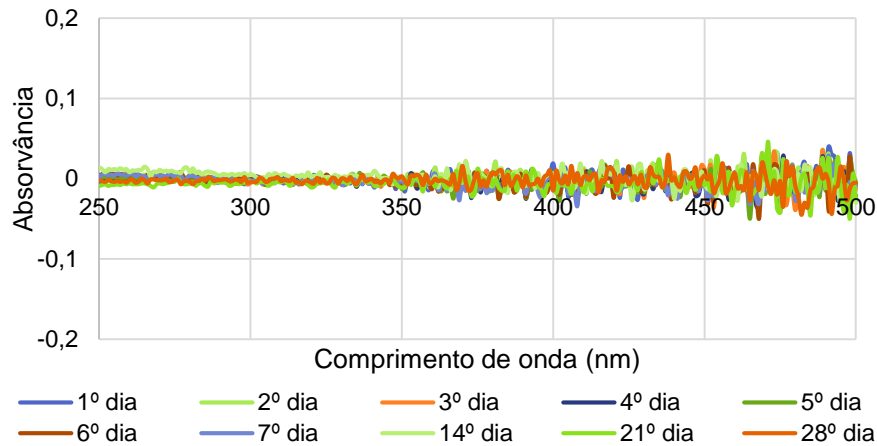


Figura 8.7: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0,01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0% de GO e 6% de agente reticulante (GDA).

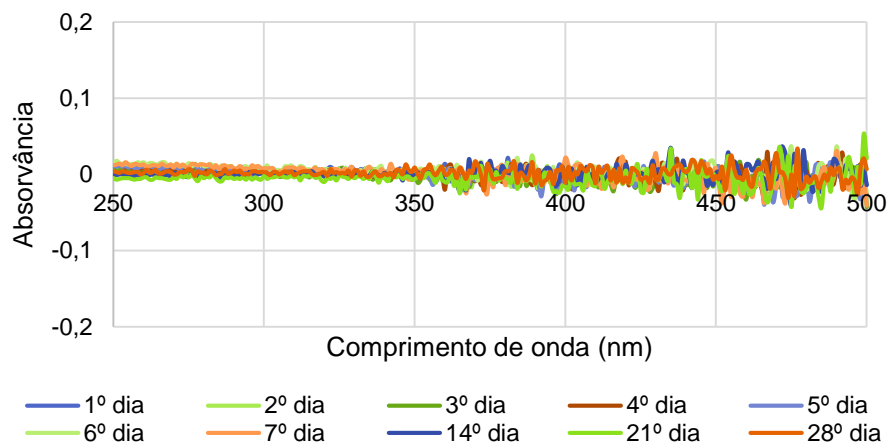


Figura 8.8: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0,01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0,05% de GO alinhada, e 6% de agente reticulante (GDA).

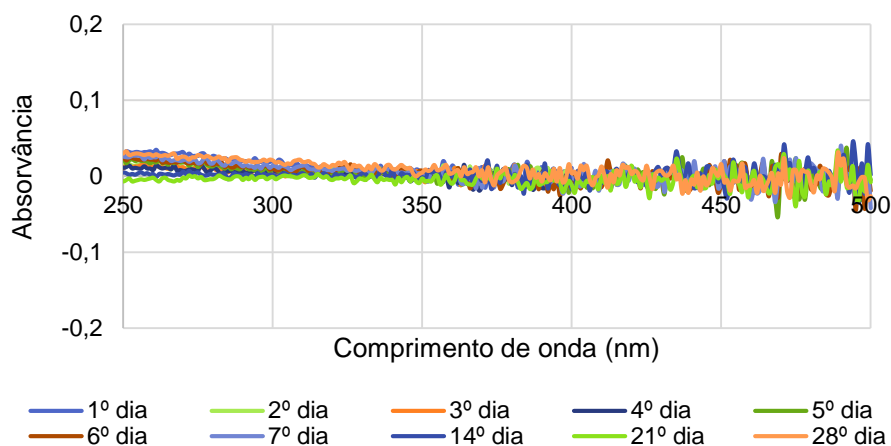


Figura 8.9: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.1% GO, não-alinhada e 6% de agente reticulante (GDA).

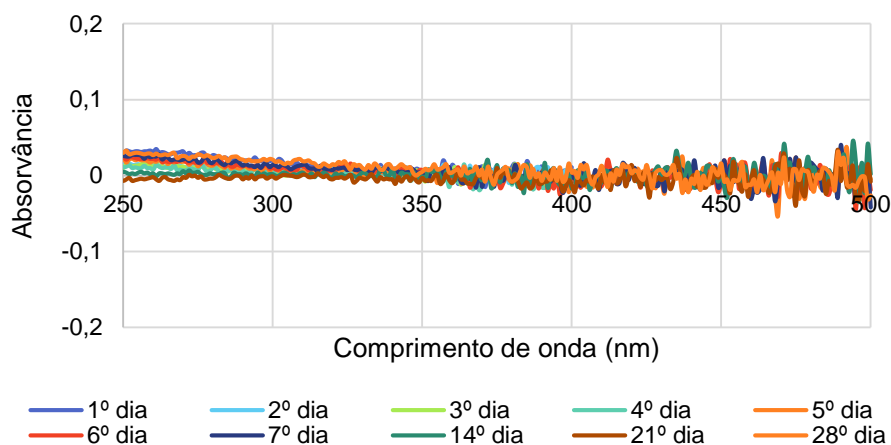


Figura 8.10: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.1% GO, alinhada e 6% de agente reticulante (GDA).

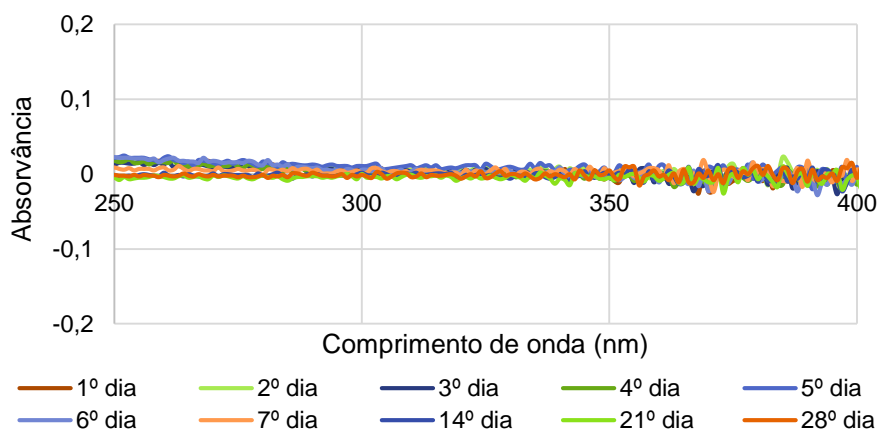


Figura 8.11: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.2% GO, não-alinhada e 6% de agente reticulante (GDA).

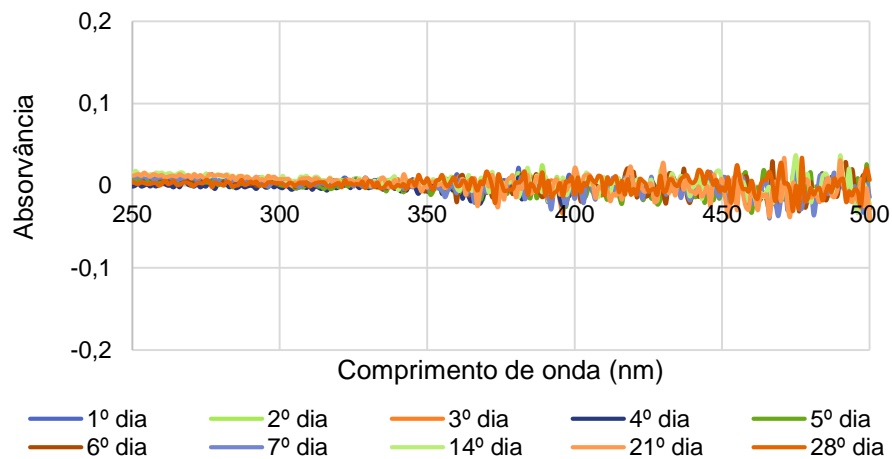


Figura 8.12: Espectros de absorvâncias obtidos após diferentes tempos de imersão em solução de 0.01M de tampão fosfato (PBS) e pH 7, de uma membrana de álcool polivinílico (PVA) com 0.2% GO, alinhada e 6% de agente reticulante (GDA).

Anexo III – Ângulos de contacto da membrana de PVA com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) e 6% GDA.

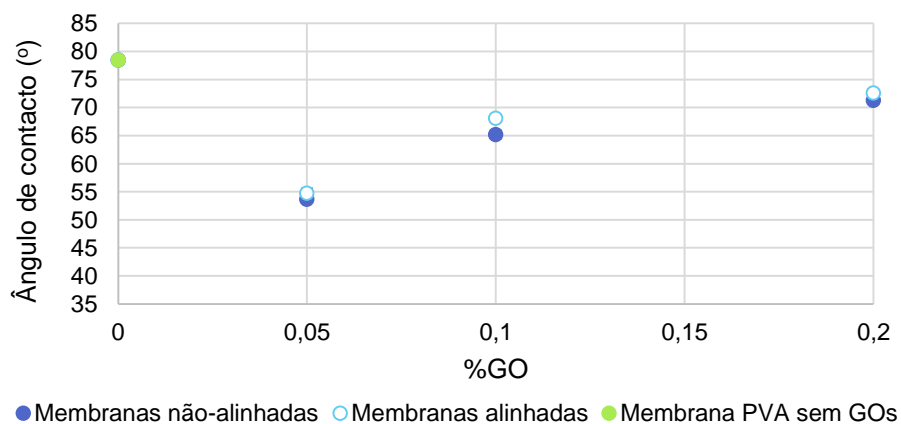


Figura 8.13: Medição de ângulos de contacto da membrana de PVA com diferentes concentrações de GO (0%, 0.05%, 0.1% e 0.2%) e concentração constante de GDA (6%), no máximo grau de inchamento na ausência de campo magnético externo.

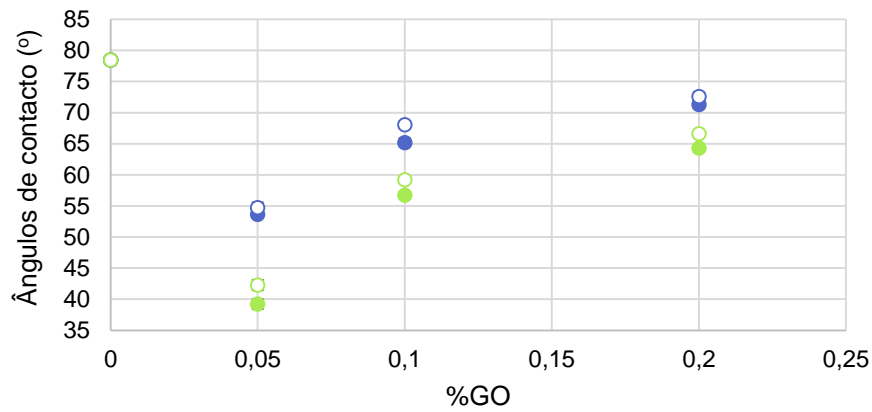


Figura 8.14: Ângulos de contacto do glicerol na superfície de membranas de PVA com 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% de GO e 6%GDA, no máximo grau de inchamento (azul) e presença de campo magnético externo de intensidade 0.0832T (verde), não-alinhadas (círculos a cheio) e alinhadas (círculos vazios).

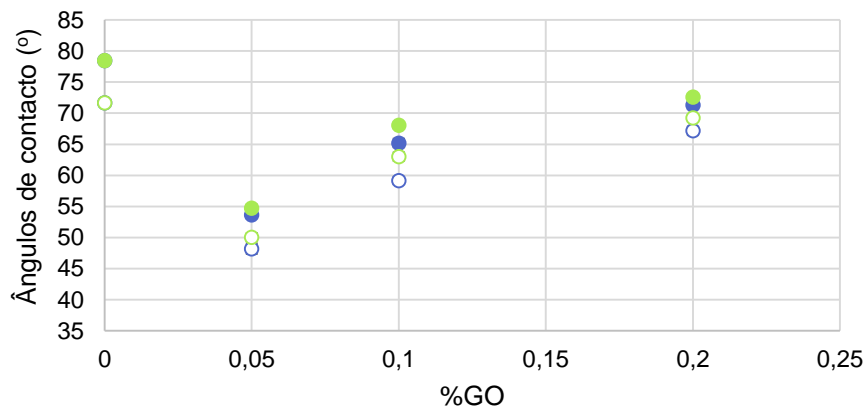


Figura 8.15: Ângulos de contacto do glicerol na superfície de membranas de PVA com 0%, 0.05%, 0.1% e 0.2% de GO e 6%GDA no máximo grau de inchamento (azul) e equilibradas à temperatura e humidade de 50% e $T=17^{\circ}\text{C}$ (verde), não-alinhadas (círculos a cheio) e alinhadas (círculos vazios).

Anexo IV – Gráficos de permeabilidade para as membranas com diferentes percentagens de GO (0.05% e 0.1%), alinhadas e não-alinhadas.

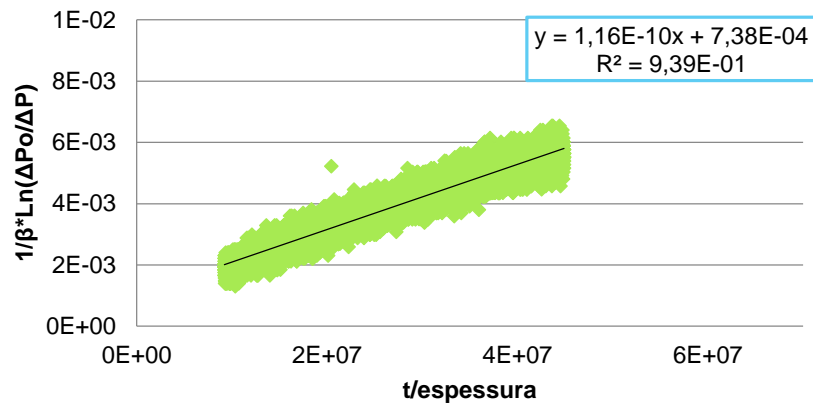


Figura 8.16: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O₂ para a membrana de PVA com 0.05% de GO, não-alinhada.

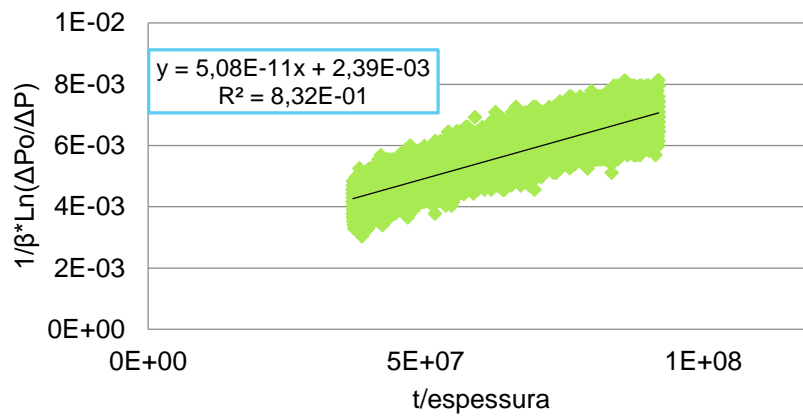


Figura 8.17: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO₂ para a membrana de PVA com 0.05% de GO, não-alinhada.

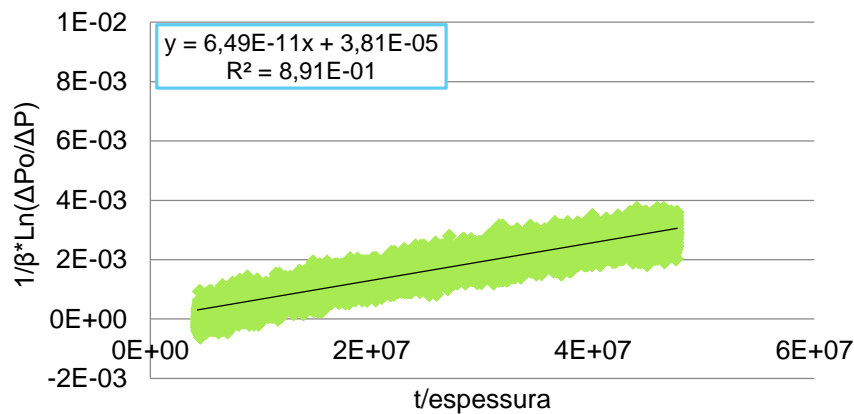


Figura 8.18: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O₂ para a membrana de PVA com 0.05% de GO, alinhada.

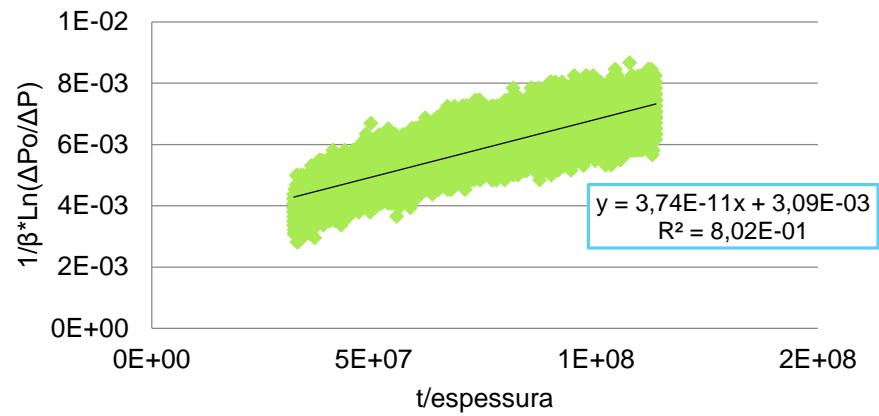


Figura 8.19: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO₂ para a membrana de PVA com 0.05% de GO, alinhada.

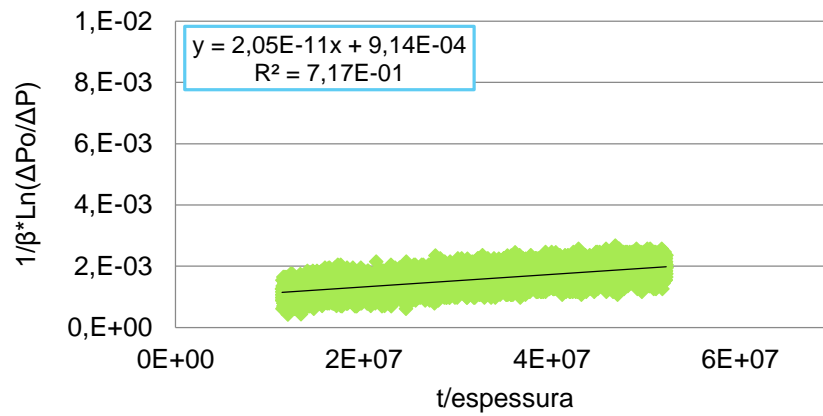


Figura 8.20: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O₂ para a membrana de PVA com 0.1% de GO, não-alinhada.

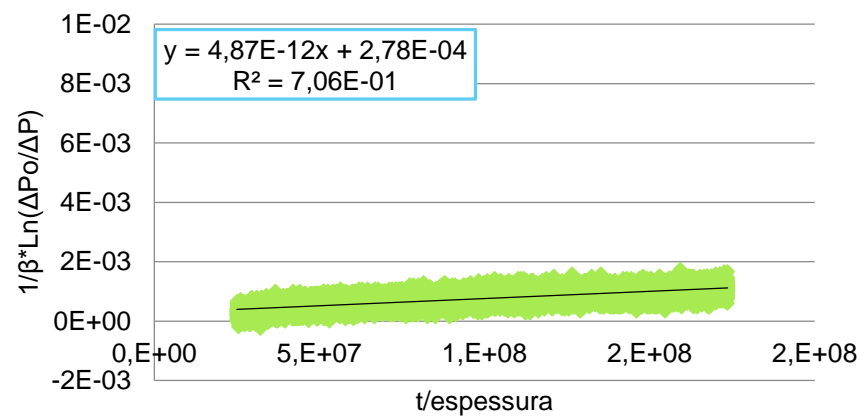


Figura 8.21: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO₂ para a membrana de PVA com 0.1% de GO, não-alinhada.

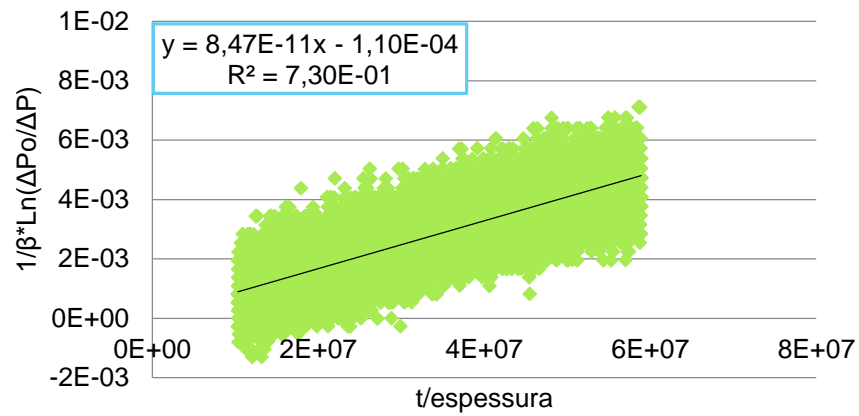


Figura 8.22: Ensaio de permeabilidade gasosa ao CO_2 para a membrana de PVA com 0.1% de GO, alinhada.

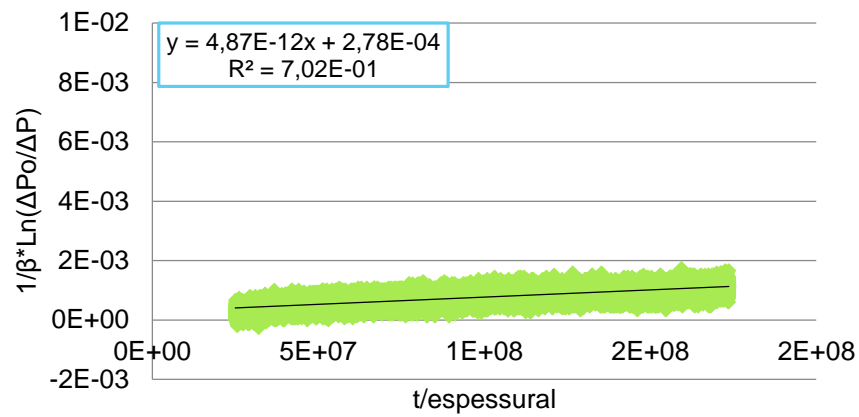


Figura 8.23: Ensaio de permeabilidade gasosa ao O_2 para a membrana de PVA com 0.1% de GO, alinhada.